



**Yara Denise Simões Gaspar**

Licenciada em Agronomia

## **Estudos de propriedades funcionais de extratos de *Hypoxis hemerocallidea***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves, Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientadora: Catarina Pereira Nobre, Bolseira de Pós-Doutoramento da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Presidente: Prof. Doutora Ana Luísa Almaça  
da Cruz Fernando

Vogal: Prof. Doutora Maria Margarida  
Boavida Pontes Gonçalves

Arguente: Cristina Maria Martins Almeida



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Setemebro, 2019**



**Yara Denise Simões Gaspar**

Licenciada em Agronomia

**Estudos de propriedades funcionais de extratos de *Hypoxis hemerocallidea***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar

**Orientadora:** Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves, Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

**Co-orientadora:** Catarina Pereira Nobre, Bolseira de Pós-Doutoramento da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

**Setembro 2019**



## **Copyright**

### **“Estudos de propriedades funcionais de extratos de *Hypoxis hemerocallidea*”**

Copyright © Yara Denise Simões Gaspar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## **Agradecimentos**

Na conclusão de mais uma etapa muito importante do meu percurso acadêmico, quero agradecer a Deus e a todos os que, de uma forma ou de outra, contribuíram para que este mestrado e nomeadamente o trabalho de conclusão de curso, tornasse numa experiência valiosa e enriquecida de conhecimento.

Em primeiro, direciono os meus agradecimentos à Professora Margarida Gonçalves, por ter aceite orientar-me. Obrigada pela extrema paciência, amizade, partilha de ideias ao longo da realização deste trabalho e pela disponibilidade que sempre teve comigo.

A Catarina Nobre, agradeço todo apoio, atenção, amizade, incentivo, dedicação, partilha de conhecimento, esforço em todas as horas para que o trabalho corresse bem.

Aos colegas do laboratório por me apoiarem, auxiliarem e incentivarem durante os dias de trabalho.

Aos professores do mestrado, o meu muito obrigado por me terem apoiado durante o percurso.

Aos meus colegas de curso, obrigada pela amizade e pelo apoio sempre, para que terminássemos o curso com êxito.

Ao IBE – Banco Mundial, pela concessão da Bolsa de Estudos.

À minha família, os meus Pais, irmãos, tios e amigos pelo apoio incondicional, por todo amor depositado em cada momento, estando presentes e me apoiando sempre. Sem vocês este caminho teria sido impossível.

A todos, com enorme gratidão, o meu sincero obrigada!





## Resumo

Este trabalho teve como objetivo o estudo da extração de compostos bioativos a partir de cormos de *Hypoxis hemerocallidea* vulgarmente conhecida por “batata africana”. Esta planta é utilizada em aplicações de medicina tradicional no sul da África Austral, particularmente em Moçambique, sendo predominantemente utilizados os extratos aquosos preparados por decocção em água fervente.

Neste trabalho testou-se a produção de extratos de *Hypoxis hemerocallidea* por maceração dos cormos em acetona ou etanol, bem como em soluções de acetona:água e etanol:água com diferentes proporções de solvente orgânico. Avaliou-se também o efeito da remoção da pele do corno no rendimento de extração e características dos extratos obtidos, utilizando como solventes de extração acetona, etanol e água fervente. Os extratos obtidos foram caracterizados quanto ao seu rendimento, à sua atividade antioxidante (atividade redutora férrica e atividade anti-radicalar em relação ao DPPH), e quanto ao seu teor de compostos fenólicos totais. O fator que mais afetou quer o rendimento de extração, quer o teor de fenóis totais e a atividade antioxidante dos extratos foi a natureza da matriz, ou seja, o estado fisiológico do corno. Os extratos líquidos obtidos com acetona e etanol apresentaram no geral valores mais elevados de fenóis totais e atividade antioxidante do que os correspondentes extratos obtidos com água fervente, mas foram comparáveis quando avaliados para os extratos secos. Nos ensaios com misturas binárias de acetona:água ou etanol:água, o aumento da percentagem de solvente orgânico favoreceu o teor de fenóis totais bem como a atividade redutora férrica e a atividade anti-radicalar relativa ao DPPH. A composição dos extratos foi avaliada por HPLC-DAD tendo-se encontrado picos cromatográficos correspondentes ao hipoxósido, dehidroxihipoxósido e bis-dehidroxihipoxósido em todos os extratos. Nos extratos de acetona encontrou-se um pico intenso correspondente a um ácido hidroxibenzóico e no extrato aquoso encontraram-se diversos picos correspondentes a flavonóis. Extratos de acetona, etanol e água fervente foram submetidos a digestão gastrointestinal simulada para avaliar a suscetibilidade dos seus compostos ativos e das suas propriedades funcionais ao processo digestivo. A digestão gastrointestinal simulada provocou um decréscimo 76 % e 83 % do teor de fenóis totais e de 75 % e 87 % da atividade antiradicalar relativa ao DPPH. Em contrapartida, a redução das áreas cromatográficas do pico correspondente ao hipoxósido foi de 26 %, 25 % e 68 % respetivamente para os extratos de acetona, etanol e água fervente. Os resultados obtidos indicam que os solventes orgânicos puros acetona e etanol são uma alternativa ao método tradicional produzindo extratos mais límpidos resistentes à contaminação microbiana e a partir dos quais o solvente pode ser facilmente eliminado.

**Palavras-chave:** *Hypoxis hemerocallidea*, extração, atividade antioxidante, digestão gastrointestinal simulada



## Abstract

This work aimed to study the extraction of bioactive compounds from corms of *Hypoxis hemerocallidea* commonly known as the "African potato". This plant is used in traditional medicine applications in southern Africa, particularly in Mozambique, predominantly using aqueous extracts prepared by decoction in boiling water.

In this work the production of *Hypoxis hemerocallidea* extracts was tested by maceration of the corms in acetone or ethanol, as well as in acetone: water and ethanol: water solutions with different proportions of organic solvent. The effect of corm skin removal on the extraction yield and characteristics of the extracts obtained was also evaluated using acetone, ethanol and boiling water as extraction solvents. The extracts obtained were characterized by their yield, their antioxidant activity (ferric reducing activity and anti-radical activity in relation to DPPH), and their content of total phenolic compounds. The factor that most affected both the extraction yield, the total phenol content and the antioxidant activity of the extracts was the nature of the matrix, that is, the physiological state of the chorus. The liquid extracts obtained with acetone and ethanol generally presented higher values of total phenols and antioxidant activity than the corresponding extracts obtained with boiling water but were comparable when evaluated for dry extracts. In the tests with binary acetone: water or ethanol: water mixtures, the increase in the percentage of organic solvent favored the third of total phenols as well as the ferric reducing activity and anti-radical activity related to DPPH. The composition of the extracts was evaluated by HPLC-DAD and chromatographic peaks corresponding to hypoxide, dehydroxyhypoxide and bis-dehydroxyhypoxide were found in all extracts. In the acetone extracts there was an intense peak corresponding to a hydroxybenzoic acid and in the aqueous extract several peaks corresponding to flavonols. Acetone, ethane and boiling water extracts were subjected to simulated gastrointestinal digestion to evaluate the susceptibility of their active compounds and their functional properties to the digestive process. Simulated gastrointestinal digestion caused a 76-83 % decrease in total phenol content and 75-87 % decrease in DPPH-related antiradical activity. In contrast, the reduction in the chromatographic areas of the hypoxide peak was 26 %, 2 5% and 68 % respectively for acetone, ethanol and boiling water extracts. The results obtained indicate that pure organic solvents acetone and ethanol are an alternative to the traditional method producing clearer extracts resistant to microbial contamination and from which the solvent can be easily eliminated.

**Keywords:** *Hypoxis hemerocallidea*, extraction, antioxidant activity, simulated gastrointestinal digestion,



## Índice

Copyright.....	iii
Agradecimentos.....	v
Resumo .....	vii
Abstract .....	ix
Índice .....	xi
Índice de tabelas.....	xiii
Índice de figuras.....	xv
Lista de abreviaturas .....	xvii
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Importância da utilização de plantas medicinais .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. A batata africana.....</b>	<b>2</b>
1.2.1. Descrição botânica e distribuição geográfica.....	2
1.2.2. Práticas agrícolas.....	5
1.2.3. Composição química da batata africana .....	6
<b>1.3. Aplicações da batata africana .....</b>	<b>8</b>
1.3.1. Medicina tradicional.....	8
1.3.2. Indústria e comercialização .....	12
1.3.3. Estudos de Bioacessibilidade.....	14
<b>1.4. Objectivos .....</b>	<b>19</b>
<b>2. Materiais e Métodos .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1. Matéria-prima .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2. Caracterização da matéria-prima.....</b>	<b>20</b>
2.2.1. Determinação do teor de humidade.....	20
2.2.2. Determinação do teor de cinzas .....	21
2.2.3. Determinação do teor de gordura.....	21
2.2.4. Determinação de proteína total .....	22
2.2.5. Hidratos de carbono .....	22
<b>2.3. Preparação de extratos.....</b>	<b>22</b>
2.3.1. Extrato aquoso (método tradicional) .....	23
2.3.2. Extratos de etanol e acetona.....	23
<b>2.4. Caracterização dos extratos de cormos de <i>H. hemerocallidea</i>.....</b>	<b>24</b>
2.4.1. Determinação do rendimento de extração .....	24
2.4.2. Determinação do teor de compostos fenólicos totais - Método de Folin-Ciocalteu ....	24
2.4.3. Determinação da atividade antioxidante – DPPH .....	25
2.4.4. Determinação da atividade antioxidante de redução do Fe (III) a Fe (II) – FRAP .....	26

2.4.5. Determinação do teor de açúcares redutores .....	27
<b>2.5. Análise dos compostos presentes nos extratos da batata africana por HPLC-DAD ....</b>	<b>28</b>
<b>2.6. Digestão gastrointestinal simulada de um extrato de BA selecionado.....</b>	<b>28</b>
<b>3. Resultados e Discussão.....</b>	<b>30</b>
3.1. Caracterização da matéria-prima .....	30
3.2. Rendimentos de extração.....	31
3.3. Caracterização dos extratos.....	35
3.3.1. Fenólicos totais, atividade redutora férrica e atividade antiradicalar de extratos de <i>H. hemerocallidea</i> obtidos a partir de diferentes cormos com diferentes solventes (acetona, etanol e água fervente).....	35
3.3.2. Fenólicos totais, atividade redutora férrica e atividade antiradicalar de extratos de <i>H. hemerocallidea</i> obtidos com misturas binárias de água e acetona .....	42
3.3.3. Fenóis totais, atividade redutora férrica e atividade antiradicalar de extratos de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> obtidos com misturas binárias de água e etanol .....	43
3.3.4. Fenóis totais, atividade redutora férrica e atividade antiradicalar de extratos de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> obtidos com diferentes solventes a partir de cormos com e sem pele.....	46
<b>3.4. Perfil cromatográfico por HPLC-DAD .....</b>	<b>48</b>
<b>3.5. Ensaio de digestão intestinal.....</b>	<b>53</b>
3.5.1. Caracterização dos extratos de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> e dos correspondentes digeridos após digestão intestinal.....	53
3.5.2. Perfil cromatográfico de HPLC-DAD dos extratos de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> e dos correspondentes digeridos após digestão intestinal.....	55
<b>4. Conclusões.....</b>	<b>59</b>
<b>Referência bibliográficas .....</b>	<b>61</b>
<b>Anexo A1.....</b>	<b>67</b>

## Índice de tabelas

Tabela 1.1: Principais características botânicas de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> .	3
Tabela 1.2: Métodos analíticos atualmente aplicados em plantas medicinais comercializadas na África do Sul para a identificação de novos compostos de espécies de biomarcadores.	6
Tabela 1.3: Utilizações tradicionais e constituintes químicos de espécies de <i>Hypoxis</i> mais utilizadas na medicina tradicional Africana.	11
Tabela 1.4: Exemplos de algumas formulações à base de plantas que envolvem constituintes do extrato <i>Hypoxis</i> que estão disponíveis no mercado.	13
Tabela 1.5: Métodos de extração de BA e respectiva forma de isolamento.	16
Tabela 1.6: Actividade biológica dos extratos de <i>H. hemerocallidea</i> e dos seus constituintes.	18
Tabela 2.1: Composição do reagente FRAP.	26
Tabela 3.1: Composição dos cormos de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> .	30
Tabela 3.2: Rendimento de extração ( $\eta$ ) a partir de diferentes cormos de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> extraídos com diferentes solventes (acetona, etanol e água fervente).	31
Tabela 3.3: Influência da percentagem de solvente orgânico no solvente de extração e da remoção da pele do corno de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> no rendimento de extração.	33
Tabela 3.4: Variação da área cromatográfica do hipoxósido e do dehidroxihipoxósido entre os extratos de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> e os respetivos digeridos expressa em termos de áreas totais e de % de recuperação.	57
Tabela A1.1: Rendimentos de extração de cormos de <i>Hypoxis hemerocalidea</i> com diferentes solventes.	67
Tabela A1.2: Fenóis totais nos extratos obtidos com diferentes solventes a partir de diferentes cormos de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> .	68
Tabela A1.3: Atividade antioxidante de redução férrica nos extratos obtidos com diferentes solventes a partir de diferentes cormos de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> .	69
Tabela A1.4: Atividade anti-radicalar relativamente ao DPPH dos extratos obtidos com diferentes solventes a partir de diferentes cormos de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> .	70
Tabela A1.5: Caracterização de extratos obtidos com misturas de acetona e água com diferentes percentagens do solvente orgânico.	71
Tabela A1.6: Caracterização de extratos obtidos com misturas de etanol e água com diferentes percentagens do solvente orgânico.	72
Tabela A1.7: Caracterização de extratos obtidos com diferentes solventes (acetona, etanol e água fervente) a partir de corno com pele ou sem pele.	73
Tabela A1.8: Teor de compostos fenólicos totais (mg eq. EAG/L) e atividade anti-radicalar relativa ao DPPH (mg eq. de Trolox/L) de extratos de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> , obtidos com acetona, etanol e água fervente e dos correspondentes digeridos após digestão gastrointestinal simulada.	75





## Índice de figuras

Figura 1.1: Parte subterrânea de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> (Fonte: <a href="https://biodinamica.co.mz/">https://biodinamica.co.mz/</a> ). .....	2
Figura 1.2: Flor de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> (Fonte: <a href="https://biodinamica.co.mz/">https://biodinamica.co.mz/</a> ). .....	3
Figura 1.3: Cormos da batata africana ( <i>in natura</i> e cortado ao meio). .....	4
Figura 1.4: Mapa ilustrativo de distribuição de <i>Hypoxis</i> spp. (Sathekge, 2010). .....	5
Figura 1.5: Estruturas do hipoxósido, rooperol e $\beta$ -sitosterol (Nyinawumuntu, 2009). .....	7
Figura 1.6: Estruturas químicas de norlinhanos encontrados em extratos de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> . .....	8
Figura 1.7: Extrato de batata africana comercial (Fonte: <a href="https://herbalandnutritional.wordpress.com/tag/benefit-of-swissgardes-african-potato/">https://herbalandnutritional.wordpress.com/tag/benefit-of-swissgardes-african-potato/</a> ). .....	12
Figura 2.1: Amostras de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> utilizadas neste trabalho. ....	20
Figura 2.2: Exemplo de reta de calibração utilizada na determinação do teor de compostos fenólicos totais. ....	25
Figura 2.3: Exemplo de recta de calibração para a determinação de atividade anti-radicalar (DPPH). ....	26
Figura 2.4: Reta de calibração utilizada nos ensaios de FRAP. ....	27
Figura 2.5: Recta de calibração utilizada para a determinação de açúcares redutores pelo método DNS. ....	28
Figura 3.1: Rendimento de extração a partir de diferentes cormos de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> extraídos com diferentes solventes (acetona, etanol e água fervente). .....	34
Figura 3.2: Influência da percentagem de solvente orgânico no solvente de extração e da remoção da pele do corno de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> no rendimento de extração. ....	34
Figura 3.3: Teor de fenóis totais em extratos de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> obtidos a partir de diferentes cormos extraídos por maceração com a) acetona, b) etanol e c) água fervente (método tradicional). ....	37
Figura 3.4: Atividade antioxidante de redução férrica de extratos de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> obtidos a partir de diferentes cormos extraídos por maceração com a) acetona, b) etanol e c) água fervente (método tradicional). ....	39
Figura 3.5: Atividade anti-radicalar relativa ao DPPH de extratos de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> obtidos a partir de diferentes cormos extraídos por maceração com a) acetona, b) etanol e c) água fervente (método tradicional). ....	41
Figura 3.6: Fenóis totais, atividade redutora férrica e atividade antiradicalar de extratos de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> obtidos com misturas binárias de água e acetona com diferentes percentagens de solvente orgânico. ....	43
Figura 3.7: Fenóis totais, atividade redutora férrica e atividade antiradicalar de extratos de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> obtidos com misturas de água e etanol com diferentes percentagens de solvente orgânico. ....	45
Figura 3.8: Fenóis totais, atividade redutora férrica e atividade antiradicalar de extratos de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> obtidos com diferentes solventes a partir de cormos com e sem pele. ....	47
Figura 3.9: Perfil cromatográfico do extrato de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> obtido com acetona a partir do corno B3 (1. ácidos hidroxibenzóicos, 2. Rooperol ou isómeros, 3. isómeros do hipoxósido, 4. <i>Hipoxósido</i> , 5. <i>dehidroxihipoxósido</i> , 6. <i>bis-dehidroxihipoxósido</i> ). ....	50

Figura 3.10: Perfil cromatográfico do extrato de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> obtido com etanol a partir do corno B3 (1. ácidos hidroxibenzóicos, 2. Rooperol ou isômeros, 3. isômeros do hipoxósido, 4. <i>Hipoxósido</i> , 5. <i>dehidroxihipoxósido</i> , 6. <i>bis-dehidroxihipoxósido</i> ). .....	51
Figura 3.11: Perfil cromatográfico do extrato de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> obtido com água fervente a partir do corno B3(1. ácidos hidroxibenzóicos, 2. Rooperol ou isômeros, 3. isômeros do hipoxósido, 4. <i>Hipoxósido</i> , 5. <i>dehidroxihipoxósido</i> , 6. <i>bis-dehidroxihipoxósido</i> , 7. flavonóis).....	52
Figura 3.12: Teor de compostos fenólicos totais (mg eq. EAG/L) de extratos de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> , obtidos com acetona, etanol e água fervente e dos correspondentes digeridos após digestão gastrointestinal simulada. ....	53
Figura 3.13:Atividade anti-radicalar em relação ao DPPH (mg ET/g extrato) de extratos de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> , obtidos com acetona, etanol e água fervente e dos correspondentes digeridos após digestão gastrointestinal simulada.....	54
Figura 3.14: Perfil cromatográfico por HPLC-DAD dos extratos de de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> obtidos com etanol e dos correspondentes digeridos após digestão gastrointestinal simulada. ....	56
Figura 3.15: Perfil cromatográfico por HPLC-DAD dos extratos de <i>Hypoxis hemerocallidea</i> obtidos com água fervente e dos correspondentes digeridos após digestão gastrointestinal simulada.....	57

## **Lista de abreviaturas**

**BA** Batata africana

**DNS** Reagente de ácido 3,5-dinitrosalicílico

**FRAP** *Ferric Reduction Antioxidant Power* – Poder de redução do íon Ferro

**FID** *Flame ionization detector* – Detector de ionização de chama

**GC** Cromatografia gasosa

**HBP** Hipertrofia benigna da próstata

**HIV** Vírus de imunodeficiência humana

**HPLC** *High performance Liquid chromatography* – Cromatografia líquida de alta eficiência

**PDA** Matriz de Fotodiodos

**LC-MS** Cromatografia Líquida

**MIC** Concentrações inibitórias mínimas

**MS** Espectrometria de massa

**NMR** Detector magnético nuclear

**UV** Ultravioleta

**TLC** Cromatografia de camada fina de alto desempenho



# 1. Introdução

## 1.1. Importância da utilização de plantas medicinais

O uso de plantas como remédios faz parte da humanidade, dado que ocorre desde há várias gerações e durante séculos. Os medicamentos a base de plantas em medicina tradicional incluem ervas, materiais à base de plantas, talos, folhas, cascas, contendo ingredientes ativos, partes de plantas ou outros materiais vegetais, ou combinações entre eles. O uso de plantas medicinais também está presente em diversas crenças culturais e costumes tradicionais, como na tradição chinesa, indiana, árabe, sul americana e africana (Mbendana et al., 2019).

O uso de medicamentos a base de plantas na manutenção da saúde, prevenção, alívio ou tratamento de doenças envolve o uso de conhecimentos, habilidades e práticas baseadas nas teorias, crenças e experiências indígenas das diferentes culturas, que podem ser ou não negativas. Com o início do século XX, observou-se um declínio no uso de medicamentos a base de plantas principalmente em países desenvolvidos, devido à produção de medicamentos sintéticos. Em contraste, a prática nunca parou nos países em desenvolvimento, uma vez que ela representa frequentemente o único sistema terapêutico a que as pessoas têm acesso a um nível local (Mbendana et al., 2019).

Hoje em dia, as plantas medicinais estão a ganhar popularidade novamente, porque apresentam diversos benefícios tais como, menos efeitos colaterais, melhor adesão ao paciente, custo relativamente baixo, elevada acessibilidade e alta aceitabilidade, por ser uma prática usada há muitos anos. Por exemplo, atualmente, tem vindo a ser feito o uso combinado de medicamentos a base de plantas com medicamentos anti-retrovirais, cuja combinação origina uma interação farmacocinética e/ou farmacodinâmica entre o princípio ativo e ervas. Essas interações farmacocinéticas entre drogas e ervas, influenciam a sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, a sua eficácia terapêutica (Brown et al., 2008).

Relatórios de pesquisa em todo o mundo indicam que pacientes com cancro recorrem a plantas medicinais como uma terapia alternativa e simultânea ao tratamento, e neste momento são reconhecidas mais de 3000 espécies com propriedades anti-cancerígenas. O Instituto Nacional do Cancro dos Estados Unidos da América (EUA) reconheceu o potencial de produtos naturais como fontes de medicamentos anti-neoplásicos na década de 1950 e desde então contribuiu para a descoberta de novos medicamentos anti-cancerígenos que ocorrem naturalmente (Madikizela & McGaw, 2019).

De acordo com Mothibe & Sibanda (2016) aproximadamente 80 % da população africana usa a medicina tradicional, tanto nos cuidados primários de saúde ou em simultâneo com a medicina convencional, principalmente devido à sua acessibilidade. Em alguns casos, as pessoas preferem a medicina tradicional à medicina convencional.

No início da década de 1970, um extrato hidroalcoólico de *Hipoxis hemerocallidea* foi patenteado com uma longa lista de propriedades benéficas: anti-inflamatória, anti-biótica, anti-artrítica, anti-aterosclerótica, diurética e estimulante das atividades musculares e hormonais. Suplementos nutricionais

e produtos farmacêuticos baseados nesta planta e focados no tratamento da hiperplasia prostática benigna (HBP) estão disponíveis comercialmente no mercado (Laporta et al., 2007).

Aclamada como planta milagrosa, a *H. hemerocallidea* tem sido usada como medicamento tradicional nas últimas décadas com o nome incorreto de “batata africana” que é um nome familiar em Moçambique e na África do Sul. Hoje, é um suposto componente de numerosas preparações medicinais com elevado potencial para o tratamento de doenças, mas normalmente a batata vem sendo usada sem receita.

## 1.2. A batata africana

### 1.2.1. Descrição botânica e distribuição geográfica

A *Hypoxis rooperi*, atualmente conhecida como *Hypoxis hemerocallidea* Fisch., C.A.Mey & Avé-Lall, designada como “batata africana”, “*star flower*” (inglês), e “*inkomfe*” (zulu) é um género de plantas com flores pertencentes à família Hypoxidaceae, com cerca de 90 espécies em todo o mundo e onde o género *Hypoxis* é o maior. A designação “batata africana” é, no entanto um nome inadequado, uma vez que a porção terrestre da planta não se assemelha a uma batata (Jordaan, 2015; Laporta et al., 2007).

A batata africana (BA) é quase cosmopolita, existindo desde o sudoeste da Ásia, Austrália, África e América do Norte e do Sul. Em África, o género *Hypoxis* é amplamente utilizado para fins medicinais na região da África Austral, sendo encontrado no Sul e amplamente distribuído nas regiões de savana, principalmente na Tanzânia, em Moçambique, na África de Sul e no Zimbabwe, apresentando cerca de 41 espécies na África Austral (Katerere & Eloff, 2008; Nair et al., 2007).

A *Hypoxis hemerocallidea* é também conhecida como “planta milagrosa”. É uma planta perene, herbácea, geófita e sem haste, com grandes cormos ou bulbos, tal como se verifica na Figura 1.1 (Katerere & Eloff, 2008). Apresenta rizomas subterrâneos ou rebentos tuberosos e raízes adventícias grossas e carnudas ligadas à base, que lhe permite sobreviver sob condições de alto stress (Jordaan, 2015; Laporta et al., 2007).



Figura 1.1: Parte subterrânea de *Hypoxis hemerocallidea* (Fonte: <https://biodinamica.co.mz/>).

É caracterizada por folhas longas em forma de cinta e flores amarelas brilhantes em forma de estrela, tal como representado na Figura 1.2. A planta é muito atraente e resistente, caracterizada por hastes em forma de alça, folheadas em pêlos verdes grossos que não são ramificados e as bases de folhas em algumas espécies são encerradas numa bainha que cria um caule falso em forma de lança (Laporta et al., 2007). As flores são transportadas em 5 ou 6 inflorescências eretas delgadas, cada uma carregando de 5 a 13 flores amarelas brilhantes chamadas de *yellow stars* com 6 pétalas, 6 estames livres surgem da base das pétalas com antenas proeminentes, com uma forma curta e com um robusto estigma. As flores têm vida curta e fecham ao meio-dia e abrem sequencialmente da base ao ápice. Normalmente, 1-3 flores são abertas ao mesmo tempo, incentivando a polinização cruzada. As sementes são duras, pretas, lisas e brilhantes. O tamanho das folhas tem até 30 cm de comprimento e florescem livremente durante o verão, de outubro a janeiro (Van Wyk et al., 1997).



Figura 1.2: Flor de *Hypoxis hemerocallidea* (Fonte: <https://biodinamica.co.mz/>).

A BA ocorre numa grande variedade de habitats, incluindo colinas arenosas na margem das florestas das dunas, pradarias rochosas, encostas secas e planaltos. Sendo amplamente explorada comercialmente, devido a seus muitos usos etnobotânicos, ocorreu um declínio nas suas subpopulações (Mwinga et al., 2019). A Tabela 1.1 apresenta um resumo das principais características botânicas da *H. hemerocallidea*.

Tabela 1.1: Principais características botânicas de *Hypoxis hemerocallidea*.

<b>Nome Botânico</b>	<i>Hypoxis hemerocallidea</i>
<b>Família</b>	Hypoxidaceae – <i>Star lily</i>
<b>Nomes comuns</b>	Batata Africana, <i>star flower</i> , <i>yellow stars</i>
<b>Grupo de plantas</b>	Bulbo, cormos, rizoma, tubérculos, bulbo epigeal
<b>Tamanho da planta</b>	Pequena e média (10-30 cm)
<b>Posição</b>	Sol
	6 pétalas em forma de estrela
<b>Flor</b>	Estação – todo o ano (inverno, verão)
	Cor amarela

Taxonomicamente, *H. hemerocallidea* pertence à família Hypoxidaceae (família *Star lily*). Esta planta foi descrita pela primeira vez por Linnaeus em 1759. O epíteto *Hypoxis* vem da palavra grega (hypo) que significa abaixo e (oxi), que significa nítida, que se refere ao bulbo apontado para a base (Oguntibeju et al., 2016).

A super família Hypoxidaceae é composta por 8 gêneros e 130 espécies. As várias espécies de *Hypoxis*, incluindo *H. rigidula*, *H. hemerocallidea*, *H. obtusa*, *H. galpinii*, *H. colchicifolia* e *H. acuminata*, são morfologicamente semelhantes, e todas elas são usadas na medicina tradicional, dado que se supõe que contêm componentes químicos similares (Bassey et al., 2015).

A família de plantas das Hypoxidaceae pertence à classe monocotiledóneas. Os membros das hypoxidaceae são ervas geofíticas perenes com cormos subterrâneos e abundantes raízes adventícias que lhes permitem sobreviver sob condições de alto stress. Externamente, o cormo é castanho a preto coberto de pelos eriçados, amarelado a verde brilhante internamente, quando cortado em fatias frescas (Figura 1.3). Escurece rapidamente quando exposto ao ar e exala um suco amarelo resinoso e com sabor desagradável. Os cormos diferem muito em diâmetro, variando de 1 a 12 cm (Oguntibeju et al., 2016).



Figura 1.3: Cormos da batata africana (*in natura* e cortado ao meio).

Embora a espécie *H. hemerocallidea* seja a espécie mais procurada, a *Hypoxis colchicifolia* é a espécie mais comercializada na África do Sul, onde os cormos desta espécie são usados como diuréticos e para o tratamento de distúrbios psiquiátricos e também para matar pequenos vermes, sendo também administrado a gado bovino para curar doença da galha e a água vermelha (babesiose bovina). A planta tem significado cultural dentro da comunidade Zulu e é usada para preparar infusões para tratamento de esterilidade e impotência (Bassey et al., 2015).

Extratos de *H. hemerocallidea* são usados para tratar uma variedade de doenças e distúrbios, incluindo hipertrofia benigna da próstata (HBP), distúrbios urinários e venéreos e diabetes. Estes extratos também são aplicados para aliviar doenças de pele, tais como erupções cutâneas e feridas e são



utilizados para a gestão do Vírus de imunodeficiência adquirida (HIV). As infusões são tomadas para tratar tonturas, distúrbios de bexiga e insanidade.

A *Hypoxis* é predominantemente de um género de pastagens que preferem luz solar, embora poucas espécies sejam capazes de tolerar condições sombreadas encontradas nas margens da floresta. Ocorre na maior parte das zonas temperadas e tropicais quentes do mundo. Na África do Sul, o género está distribuído em cinco províncias, e também no Lesotho e na Swazilândia (Figura 1.4).

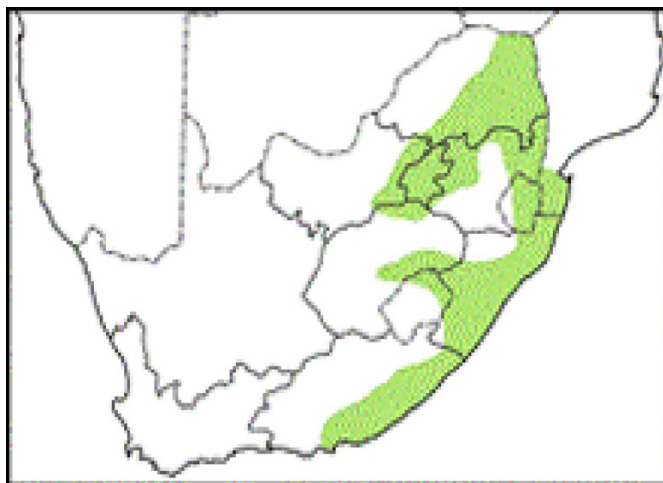


Figura 1.4: Mapa ilustrativo de distribuição de *Hypoxis* spp. (Sathekge, 2010).

Contudo, em Moçambique, a *H. hemerocallidea* tem uma distribuição geográfica muito ampla, que varia de savanas a florestas húmidas. Os cormos apresentam alta tolerância ao fogo, tendo sido já indicado que o fogo promove o crescimento de novas folhas e a floração do género (Watt and Breyer-Brandwijk, 1962).

### 1.2.2. Práticas agrícolas

Devido à alta taxa de comércio de plantas medicinais, a prática agrícola é extremamente importante para salvar algumas das plantas medicinais ameaçadas de extinção. As práticas agrícolas também ajudarão a regular a qualidade, eficácia e segurança das plantas medicinais. Portanto, é importante aplicar alguns dos métodos de propagação desenvolvidos para resgatar essas plantas da extinção.

A propagação da BA é difícil devido à dormência das sementes e a espécie não se propaga naturalmente com facilidade. A BA é tolerante a seca, resistente ao frio, muito fácil de cultivar, cresce bem em pleno sol e em solos bem drenados. A divisão dos cormos é um método mais rápido e simples de propagação de plantas (Pereus et al., 2019).

As áreas de foco da pesquisa em plantas medicinais são propagação e multiplicação, cultivo e bioatividade. A *Hypoxis* é um género bastante investigado, tendo sido desenvolvido, nos anos 80, um novo método para a germinação de sementes de *H. hemerocallidea* e *H. iridifolia*. No entanto, foi relatado que *Hypoxis* é difícil de se propagar a partir de sementes, pois as sementes permanecem inativas durante

cerca de um ano após a floração. E assim sendo, para que ocorra germinação parcial é necessária a remoção mecânica completa do revestimento duro das sementes para que leve a germinação parcial e que a dormência seria a principal razão pela qual poucas mudas são encontradas em campo (Hammerton & van Staden, 1988).

Algumas espécies de *Hypoxis* da África do Sul com valor medicinal e hortícola, como *H. hemerocallidea*, *H. obtusa*, *H. acuminata* e *H. rigidula* foram micropropagadas, e o método foi bem-sucedido. Mais de 90 % das espécies regeneradas de *Hypoxis* sobreviveram à aclimação. O melhor enraizamento foi obtido usando o meio Murashige e Skoog sem reguladores de crescimento (Appleton & van Staden, 1995). No entanto, a organogênese da parte aérea pareceu ser função da atividade da citocinina, uma vez que as auxinas isoladamente não iniciaram a formação de brotações. A divisão do porta-enxerto, encontra-se relatada como sendo um método mais rápido e bem-sucedido de propagar estas plantas (Hammerton and van Staden, 1988).

### 1.2.3. Composição química da batata africana

A *Hypoxis* é conhecida pela ocorrência de um hipoxósido (um poderoso componente antioxidante) que é um metabolito secundário da planta. Este composto é hidrolisado em rooperol no intestino grosso. Estudos farmacocinéticos indicaram que o rooperol pode ser encontrado nas fezes e os metabolitos são encontrados no soro e na urina, como glicosídeos, sulfatos, glucuronídeos e sulfuronídeos misturados. O glicosídeo tem baixa toxicidade e o núcleo que o contém também é usado como alimento e tem sido utilizado para fins tradicionais e farmacêuticos (Nair & Kanfer, 2006; Onanuga et al., 2018).

Nair e colaboradores (2007) indicam que *Hypoxis* spp. são ricas em fitoesteróis, especialmente o  $\beta$ -sitosterol e sua esterolína e o  $\beta$ -sitosterol glucósido. A parte tuberosa da *H. hemerocallidea* é a que se acredita possuir compostos bioativos. Os efeitos terapêuticos da batata africana foram atribuídos à presença de esteróis, esterolinas, norligan, daucosterol e rooperol.

Os métodos analíticos que identificam esses compostos estão descritos na Tabela 1.2.

Tabela 1.2: Métodos analíticos atualmente aplicados em plantas medicinais comercializadas na África do Sul para a identificação de novos compostos de espécies de biomarcadores.

Espécie	Compostos de biomarcadores	Técnicas analíticas	Referências
<i>Hypoxis hemerocallidea</i> Fisch., C.A.Mey.& Avé-Lall.	Hipoxósido	RP-HPLC-UV, CZE	(Albrecht et al., 1995)
	Rooperol	TLC-PDA	(Nair & Kanfer, 2006)
	Fitosterol	HPLC-DAD/NMR	(Nair et al., 2007)
	Ergosterol	GC-MS/GC-FID	(Boukes & Van De Venter, 2012)
	Stigmasterol	HPLC/LC-MS	(Mkhize & Adam, 2013)(Nsibande et al., 2018)

Na sua forma natural, o hipoxósido é inativo, mas pode ser hidrolisado em rooperol pela ação da enzima  $\beta$ -glucosidase. Esta conversão ocorre no sistema gastrointestinal, particularmente no intestino grosso em humanos e em animais, através de bactérias e da enzima  $\beta$ -glucosidase que catalisa a conversão (Mills et al., 2005; Oguntibeju et al., 2016). O hipoxósido contém duas unidades de glicose nas extremidades dos dois anéis de benzeno do esqueleto do pentineno e estes são clivados pela  $\beta$ -glucosidase para formar a aglicona – o rooperol (Figura 1.5).

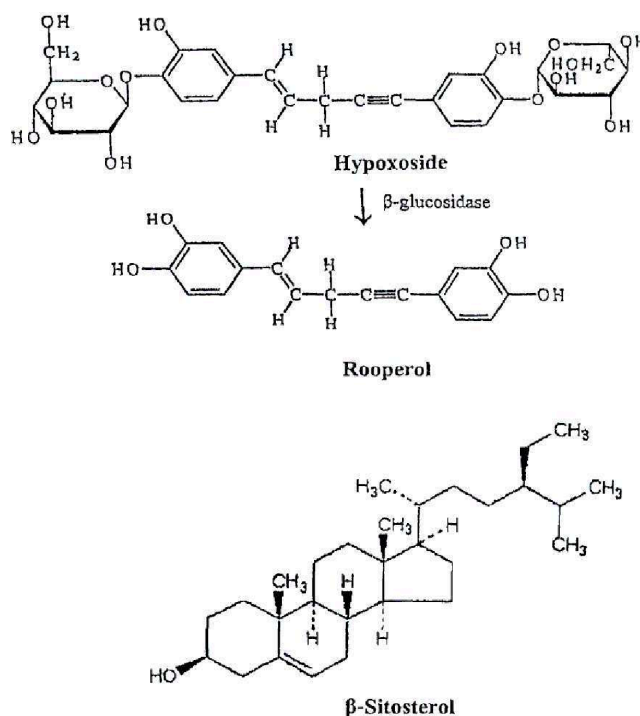


Figura 1.5: Estruturas do hipoxósido, rooperol e  $\beta$ -sitosterol (Nyinawumuntu, 2009).

O rooperol é descrito como sendo o composto ativo que possui propriedades imunomoduladoras e é reivindicado ser usado por doentes que sofrem de cancro e HIV. Baixas concentrações de rooperol podem ser seletivamente citotóxicas para as células tumorais e estimular a síntese de colagénio, inibindo o crescimento, invasão e metástase do tumor (Dietzch et al., 1999).

Estudos farmacocinéticos indicaram que o rooperol pode ser encontrado nas fezes, e metabolitos podem ser encontrados no soro e na urina, como glicosídeos, sulfatos, glucuronídeos e sulforonidas. Estes metabolitos, quando desconjugados de volta a rooperol, demonstraram ser citotóxicos para células cancerígenas (Nair et al., 2007). O rooperol também se encontra descrito como um inibidor da lipoxigenase e eficaz contra a mutagénese no teste de Ames (Hostettmann and Terreaux, 2000).

Além do rooperol e do hipoxósido, o nasasídeo também foi um dos compostos isolados de *H. nysica*. Foi descrito que esta molécula está biologicamente relacionada ao hipoxósido, uma vez que são di-glucósidos (Marini-Bettolo et al., 1985).

Além do hipoxósido e do rooperol, os cormos são relatados como contendo  $\beta$ -sitosterol, esterol, monoterpenos glicosídeos, estanóis e estigmasteróis (Laporta et al., 2007; Nair & Kanfer, 2008).  $\beta$ -

sitosterol é um esteroide vegetal, com uma estrutura semelhante ao colesterol, que era isolado de *H. hemerocallidea* no final dos anos 50 e identificado como o composto ativo contra a HBP.

Foi demonstrado também, que as espécies do gênero *Hypoxis* contêm vários açúcares e derivados de açúcar, como mucilagem, hemiceluloses, polissacarídeos e açúcares específicos, como xilose, glicose, manose, frutose e sacarose e ácido glucurônico. Compostos fenólicos também foram detectados, como ácido cafeico, ácido ferúlico e quercetina (Pegel, 1979).

Bassey e colaboradores (2015) estudaram os metabolitos secundários de outras espécies indígenas, incluindo *Hypoxis colchicifolia* e *Hypoxis galpinii* tendo encontrado diversos glicosídeos de norlignano (hipoxósido, desidroxi-hipoxósido e bis-desidroxi-hipoxósido) e dois novos glicosídeos fenólicos, 3-hidroxi-4-OβD-glucopiranosil-benzaldeído e 1,5-bis (3,4-di-hidroxifenil) -1,2-di-hidroxi-4-pentona-2-p-coumaroil-βD-glucopiranosídeo. A presença de hipoxósido nas três espécies investigadas indicou que o uso intercambiável das espécies de *Hypoxis* pelas comunidades têm algum valor medicinal. Os mesmos glicosídeos de norlinhaano (hipoxósido, desidroxi-hipoxósido e bis-desidroxi-hipoxósido) foram encontrados por Laporta e co-autores (2007) em extratos aquosos de cormos de *Hypoxis hemerocallidea*, tendo sido proposta uma fórmula geral para os diversos isômeros desta família de compostos (Figura 1.6).

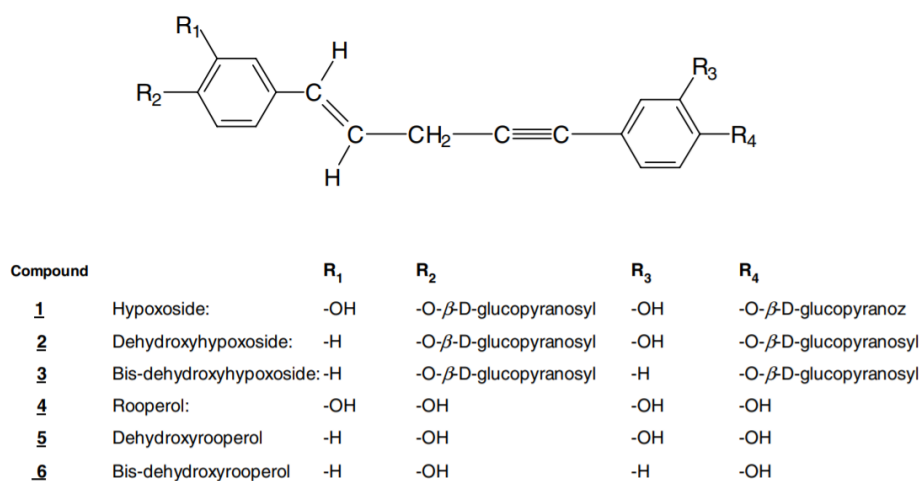


Figura 1.6: Estruturas químicas de norlinhanos encontrados em extratos de *Hypoxis hemerocallidea*.

### 1.3. Aplicações da batata africana

#### 1.3.1. Medicina tradicional

Além de suas propriedades medicinais, *Hypoxis* spp. são usados como alimento em tempos de fome pelos povos indígenas da África do Sul (Boukes & Van de Venter, 2016; Boukes & Van De Venter, 2012).

O valor medicinal de *Hypoxis hemerocallidea* foi estabelecido há muito tempo, particularmente entre o povo Zulu da África do Sul (Drewes et al., 2008). Geralmente, a *Hypoxis* é ingerida por diferentes tribos no sul da África para tratar diversas doenças, e portanto é descrita como sendo “zifozoneke”, o que significa que a planta pode ser usada para tratar muitas doenças. Os cormos triturados são utilizados para tratar borbulhas e feridas (Matsiliza & Barker, 2001). Infusões de cormos maduros são usadas na medicina tradicional africana como eméticos, para tratar tonturas, queimaduras, feridas, doenças oportunistas, ansiedade, depressão e insanidade, diabetes mellitus, cancro, poliartrite, hipertensão e asma (Katerere & Eloff, 2008).

A *Hypoxis hemerocallidea* é destacada como um incrível e maravilhoso medicamento na luta contra várias doenças, incluindo HIV/SIDA, artrite e hipertensão. Os cormos podem ser utilizados no tratamento de diabetes mellitus do tipo 2 (Musabauane et al., 2006).

*Hypoxis colchicifolia* é uma das espécies de *Hypoxis* mais procuradas no medicamento tradicional africano para a preparação de remédios, chás e tinturas de ervas. A decocção dos cormos é administrada por via oral para o tratamento das mais variadas doenças, pelo povo Xhosa. Infusões e decocções de cormos são usadas como tónicos convalescentes e fortalecedores em crianças e adultos para tuberculose, hipertrofia prostática, parasitas intestinais, dores de cabeça e tumores testiculares (Madikizela & McGaw, 2019). Infusões desta espécie também são usadas como eméticos para tratar tonturas, infecções do trato urinário, insanidade e convulsões (Miller, 1997).

Estudos com plantas de *Pittosporum viridiflorum* Sims (Pittosporaceae) e *Hypoxis colchicifolia* Baker, estão entre as plantas documentadas em Eastern Cape, África do Sul na terapia tradicional contra o cancro. A aplicação de *Hypoxis* na terapia tradicional anticancerígena é um dos usos mais proeminentes das espécies vegetais. A decocção dos cormos é administrada por via oral para o tratamento do cancro pelo povo Xhosa. Infusões e decocções de cormos são usadas como tónicos convalescentes e fortalecedores em crianças e adultos para tuberculose, hipertrofia prostática e tumores testiculares (Madikizela & McGaw, 2019).

Tradicionalmente, as decocções dessa espécie de planta são usadas para doenças cardíacas, impotência, esterilidade, parasitas intestinais, câncer, dores de cabeça e tumores testiculares (Drewes et al., 2008). Infusões do líquido também são usadas como eméticos para tratar tonturas, infecções do trato urinário e insanidade. As decocções de *Hypoxis colchicifolia* são amplamente utilizadas no tratamento de infertilidade e convulsões (Miller, 1997).

Os cormos são usados pelo povo zulu para tratar infecções do trato urinário, fraquezas cardíacas, distúrbios nervosos e tumores internos e para diferentes doenças, como, asma, tuberculose, infecção do trato urinário, dor de cabeça, fraqueza cardíaca, tontura, úlceras duodenais e gástricas, tumores internos de cancro e algumas doenças do sistema nervoso central, especialmente epilepsia (Kruger et al., 1994; Miller, 1997; Nair et al., 2007) (Tabela 1.3).

Gaidamashvili & van Staden (2006) relataram que uma variedade de extratos vegetais usados como medicamentos tradicionais para tratar desordens inflamatórias sugere fortemente que as plantas

medicinais são a principal fonte de importantes fitoquímicos. São sintetizados no metabolismo secundário da planta e conhecidos por suas substâncias ativas, por exemplo, os compostos fenólicos que fazem parte dos óleos essenciais, bem como nos taninos, saponinas e bufadienolídeos. Além disso, as partes das plantas utilizadas na cura tradicional são principalmente órgãos de armazenamento, incluindo tubérculos, bulbos, rizomas e cascas, que são fontes ricas de proteínas de armazenamento e lectinas, além de outros metabólitos secundários.

Em Moçambique, o chá da *Hypoxis* é utilizado para reforçar o sistema imunitário e foi usado por soldados para cicatrizar ferimentos. Os curandeiros tradicionais no sul de Moçambique usam o mesmo chá em conjunto com outras plantas para o tratamento de doentes com diabetes (Bouic et al., 1996).

As diferentes aplicações tradicionais de *Hypoxis* encontram-se descritas na Tabela 1.3.

Tabela 1.3: Utilizações tradicionais e constituintes químicos de espécies de *Hypoxis* mais utilizadas na medicina tradicional Africana.

Espécies	Área utilizada	Uso tradicional	Compostos químicos conhecidos	Referências
<i>Hypoxis acuminata</i>	Swazilândia	Cormos usados como alimento medicinal	Acuminósido, geraniol, hipoxódo,	(Bredenkamp et al., 1989)
<i>Hypoxis ar-gentea</i> Harv, ex Baker	Swazilândia. Lesotho	Usado para fazer amuletos de boa sorte Misturado com gordura para tratar rachaduras nas tetas de vacas. Cormos usados como alimento		(Watt and Breyer-Brandwijk, 1962)
<i>Hypoxis hemerocallidea</i> Fisch. & C.A. Mey	Sul de África	Usado para alívio de dor de dores de cabeça, doenças de estômago, disenteria, tontura, queimaduras, câncer, HIV, sintomas de hipertrofia benigna da próstata, diabetes, pressão alta, espinhas, feridas, tônico para a pele, dermatite, distúrbios mentais e como um tônico geral para a saúde. Usado como purgativo.	Glicosídeos de fitosterol ( $\beta$ -sitosterol), diglucosídeo, hipoxósido, aglicona rooperol, esteróis e esterolinas Hemantino, Penteno-bis-glucósidofenol, hipoxósido.	(Drewes et al., 1984; Katerere and Eloff, 2008; Miller, 1997; Watt and Breyer-Brandwijk, 1962)
<i>Hypoxis colchicifolia</i> Barker	Sul de África	Usado contra a esterilidade, pesadelos, fraqueza do coração. Usado como armadilha de cobra, emético, para tratar náuseas, picadas de insetos, colocadas em alimentos para destruir pequenos vermes. Usado como purgativo, diurético.	Hemantino, Penteno-bis-glucósidofenol, hipoxósido.	(Drewes and Liebenberg, 1983; Miller, 1997; Watt and Breyer-Brandwijk, 1962)

### 1.3.2. Indústria e comercialização

Vários produtos comerciais, incluindo Harzol®, Moducare®, Hypo-Plus e Prostone, contêm esteróis e esterolinas isolados ou derivados de *Hypoxis* spp., dado que esteróis e esterolinas são alguns dos ingredientes activos identificados nesta planta medicinal (Boukes & Van de Venter, 2016).

Na Alemanha muitos relatórios farmacológicos e clínicos levaram a registro de várias patentes e à comercialização do extrato de BA sob o nome comercial Harzol ® e como componente na preparação combinada Azuprostat® (V. D. Nair & Kanfer, 2006).



Figura 1.7: Extrato de batata africana comercial (Fonte: <https://herbalandnutritional.wordpress.com/tag/benefit-of-swissgardes-african-potato/>).

Na Tabela 1.4 encontram-se descritas algumas das aplicações de batata africana de produção industrial e comercialização internacional.



Tabela 1.4: Exemplos de algumas formulações à base de plantas que envolvem constituintes do extrato *Hypoxis* que estão disponíveis no mercado.

Nome comercial	Formato	Uso terapêutico	Local de acesso	Composição
Moducare ®	Cápsula	Reforço imunológico de gripes e infecções, bem como alergias e distúrbios auto-imunes dolorosos, como reumatoide e artrites	Lojas que vendem produtos de saúde e farmácias	20 mg de $\beta$ -sitosterol e 0,2 mg do seu glicósido e esta relação específica é considerada crítica
Hypo-Plus	Cápsula	Como suplemento alimentar, impulsionador de energia e modulador da imunidade	Lojas que vendem produtos de saúde e farmácia	Contem uma variedade de aminoácidos, uma seleção de vitaminas de extrato de <i>hipoxis</i>
African potato/ <i>Hypoxis hemerocallidea</i>	Cápsula	Usada para impulsionar o sistema imunológico e o tratamento e dos sistemas do HIV	Lojas que vendem produtos de saúde	300 mg de extrato seco de <i>Hypoxis hemerocallidea</i>
African Potato ( <i>Hypoxis hemerocallidea</i> )	Cápsula	Tratamento natural de HIV, reforço imunológico	Farmácias e lojas que vendem produtos de saúde	Extrato seco de <i>hipoxis hemerocallidea</i> 60 x 350 mg capsulas
African potato extract -South Africa's miracle herb	Tônico	Usado para Impulsionar o Sistema imunológico e tratamento e sintomas do HIV	lojas que vendem produtos de saúde	Esteróis e esterolinas
Stameta	Tônico	Usado para distúrbios nervosos, doenças de pele, má qualidade do sangue, pressão alta. Infecções pulmonares e renais. Problemas cardíacos, nas costas, fadiga, dores menstruais, limpa a biliar, cura o sangramento nas gengivas, sara as feridas corporais. Fortalece os ossos e estimula o sistema imunológico.	lojas que vendem produtos de saúde	Extratos de <i>hipoxis hemerocallidea</i> , menta piperita, pimenta, anisum, aloe (não específico). Fortificado com multivitaminas (não específicas), cálcio, magnésio, potássio, fósforo e zinco
African potato	Tônico	Reumatismo, pressão alta, gota e artrite, câncer, tuberculose, febre, psoríase, eczema, varizes, má circulação sanguínea, problemas de próstata	lojas que vendem produtos de saúde	Quantidade não específica de extrato de <i>hipoxis hemerocallidea</i> . Contem esteróis e esterolinas.

### 1.3.3 Estudos de Bioacessibilidade

Apesar da sua aplicação extremamente difundida em medicina tradicional, o acompanhamento científico da utilização de batata africana é bastante disperso e escasso. Ao longo do tempo, diferentes autores estudaram diferentes procedimentos de extração, bem como diferentes formas de isolar e purificar os principais metabolitos deste género, nomeadamente o hipoxósido e o rooperol. A produção e estudo dos extratos de batata africana, envolvem também a determinação das suas principais atividades a nível biológico. Segue-se uma breve revisão bibliográfica compreendendo a produção de extratos de batata africana (diferentes espécies) bem como diferentes estudos relativos às suas diversas aplicações em termos terapêuticos e de atividade biológica.

Embora a abordagem de produtos naturais para a descoberta de agentes anticancerígenos tenha sido bem-sucedida em todo o mundo, na África do Sul ainda existem poucos relatos de plantas medicinais usadas na terapia do cancro, independentemente do facto de que algumas plantas dessa região serem conhecidas em relação a células cancerígenas e os metabolitos secundários de plantas com atividade antioxidante ajudarem a aliviar o stress oxidativo, impedindo a geração de radicais livres ou eliminando os radicais livres. Portanto, candidatos a medicamentos com atividades antioxidantes e anti-inflamatórias são agentes anticancerígenos favorecidos (Madikizela & McGaw, 2019).

Betto e colaboradores (1992) descreveram a determinação de glicosídeos norlignan por HPLC usando um método gradiente, que foi alegado ser útil para a separação dos glicosídeos e para monitorizar a produção em culturas de tecidos para estabelecer a presença de glicosídeos norlignan.

Kruger e colaboradores (1994), descreveram o uso de cloridrato de guanidina e sulfato de amónio para o enriquecimento por xenobióticos em fluidos biológicos por HPLC, que foi aplicado para estudar o comportamento cromatográfico de análogos de hipoxósido e rooperol. O método também foi aplicado para analisar amostras de urina e plasma humanos para produtos de biotransformação por hipoxósidos após administração via oral. O mesmo método foi usado para analisar a extratos metanólicos de análogos de hipoxósido e rooperol em *H. hemerocallidea* e *H. latifolia*. O método aplicado, no entanto, não foi validado, e nenhum dado quantitativo foi obtido.

Alega-se que os esteróis e esterolinas presentes na BA são responsáveis por suas propriedades medicinais, mas isso ainda está para ser cientificamente comprovado. Enquanto os esteróis e esterolinas são de natureza onipresente, a presença relativamente abundante do hipoxósido, é uma característica única das plantas deste género. Assim, o hipoxósido é um marcador analítico apropriado para uso na padronização e controle de qualidade da BA e produtos relacionados (Masondo & Makunga, 2019).

De acordo com Kerwin & Jonathan (2014), a investigação dos constituintes biologicamente ativos de *H. hemerocallidea* levou ao isolamento e à elucidação estrutural dos principais compostos fenólicos e do constituinte principal desta planta, o hipoxósido b-glicosídeo. O hipoxósido e a sua aglicona, rooperol, foram os primeiros produtos naturais relatados a possuírem algo inesperado como o grupo 1,5-

diarilopent-4-ino. Entretanto, mais recentemente, tem sido relatado um número de outros produtos naturais polifenólicos derivados de plantas que possuem essa estrutura central.

Nair e colaboradores (2007) demonstraram que o rooperol tem atividade farmacológica potente, considerando que o hipoxósido atua como um pro-fármaco não tóxico e multifuncional. Além disso, o rooperol demonstrou uma semelhança estrutural com ácido nordihidroguairético (NDGA), um conhecido antioxidante forte. Além da actividade antioxidante *in vitro* confirmada pela BA, os ricos conteúdos inativos do hipoxósido (10,16 %) são prontamente convertidos para rooperol no trato gastrointestinal dos seres humanos. Esses recursos indicam que a batata africana pode ter valor como um pró-fármaco antioxidante.

Ndhkala e colaboradores (2013) produziram extratos de *H. colchicifolia* e *H. hemerocallidea* e os extratos produzidos mostraram um amplo espectro de atividades contra as cepas bacterianas e fúngicas utilizadas. Os resultados mostraram que evidências de fitosinergia entre alguns extratos de *H. colchicifolia* e *H. hemerocallidea*, como visto pela superioridade de algumas combinações de extratos quando comparados aos extratos únicos. Existem evidências indiretas de que os esteróis e esterolinas, encontrados na raiz de *Hypoxis*, têm o potencial de melhorar o sistema imunitário e também podem atuar por outras vias, como a inibição da via de sinalização mediada por fator nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), na qual as células imunes que levam à produção de reações induzíveis, como a regulação positiva das enzimas COX e citocinas pró-inflamatórias.

Verschaeve e colaboradores (2013) realizaram uma avaliação *in vitro* do potencial genotóxico de extratos aquosos de quatro espécies de *Hypoxis* (*H. hemerocallidea*, *H. colchicifolia*, *H. rigidula*, *H. acuminata*) e identificaram que nenhum dos extratos testados foi identificado como genotóxico nos ensaios realizados.

Katerere & Eloff (2008) compararam a composição química e as atividades biológicas (antibacteriana e antioxidante) de partes aéreas frescas e secas e partes subterrâneas de *Hypoxis*, com o objetivo de promover o uso da primeira, como estratégia de conservação. Descobriram que extratos etanólicos de folhas frescas apresentaram melhor atividade geral no ensaio antibacteriano com MIC (Concentrações inibitórias mínimas) de 0,63 mg/ml. Os componentes dos extratos de acetona das folhas e dos rebentos apresentaram boa atividade antioxidante. A substituição de folhas de cormos no uso medicinal da *Hypoxis* não é recomendada por causa da falta de similaridades fitoquímicas e bioativas.

Na Tabela 1.5 encontra-se um breve resumo de alguns métodos de extração e isolamento de metabolitos da BA.

Tabela 1.5: Métodos de extração de BA e respectiva forma de isolamento.

Planta/Material vegetal	Método de extração/solvente	Método de isolamento/purificação	Referências
<i>Hypoxis obtusa</i>	Metano e etanol e água (8:2)	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a separação da fração glicosídica	(Kerwin and Jonathan, 2014)
<i>Hypoxis hemerocallidea</i>		HPLC usando um método gradiente, que foi considerado útil para a separação dos glicosídeos	(Betto et al., 1992)
<i>Hypoxis hemerocallidea</i>	Metanol	Uso de cloridrato de guanidina e sulfato de amônio para o enriquecimento por xenobióticos em fluidos biológicos por HPLC,	(Kruger et al., 1994)
<i>Hypoxis hemerocallidea</i>	Acetato de etilo	Ensaio de microdiluição	(Katerere and Eloff, 2008)
<i>Hypoxis hemerocallidea</i>	Metanol	Método RP-HPLC-UV simples, preciso para detectar quantitativamente o hipoxósido em produtos naturais e comerciais.	(V. D. Nair and Kanfer, 2006)

Laporta e co-autores (2007) caracterizaram um extrato derivado de *H. hemerocallidea*, isolaram o principal composto bioativo, hipoxósido, e obtiveram sua aglicona, rooperol, por digestão enzimática. Foram obtidos dados espectrais completos de absorção, emissão de fluorescência e RMN 2D desses compostos. A capacidade antioxidante de ambos os compostos foi totalmente analisada através dos ensaios de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e capacidade antioxidante total (TEAC), e foi comparada às catequinas e os biofenólicos da azeitona. Ambos os compostos mostraram uma forte capacidade antioxidante, embora o rooperol exibisse uma atividade antioxidante mais alta contra a peroxidação lipídica, que se correlacionou com sua forte afinidade pelas membranas fosfolipídicas, derivada de seu coeficiente de partição lipídico / água extremamente alto ( $K_p = 3,4 \cdot 10^4$ ). O estudo dos valores de TEAC lipofílico (EtOH) e hidrofílico (água) revelou que mais compostos hidrofóbicos apresentaram maiores valores de TEAC lipofílico do que os hidrofílicos, indicando provavelmente que o teste TEAC lipofílico pode ser mais confiável para esses compostos. O extrato de *H. hemerocallidea* também mostrou maior eficácia antioxidante em comparação com outros extratos fortes de antioxidantes à base de plantas, como folha de oliveira ou chá verde. Além disso, não foram observadas evidências de toxicidade aguda por via oral nem efeitos adversos quando o extrato comercial de *H. hemerocallidea* contendo hipoxósido a 45% foi utilizado na dose de 2000 mg/kg. Os resultados obtidos neste trabalho podem contribuir para o entendimento da atividade biológica descrita para estes dicatécóis e do extrato de BA para aplicações alimentares e cosméticas.

Ojewole (2006), a fim de avaliar cientificamente alguns dos usos anedóticos, folclóricos e etnomédicos de *Hypoxis hemerocallidea*, examinou as propriedades anti-inflamatórias e antidiabéticas do extrato aquoso dos cormos em ratos. Os efeitos anti-inflamatórios e antidiabéticos do extrato da planta foram investigados usando-se edema de pedal (pata) fresco induzido por albumina de ovo e modelos de

diabetes mellitus induzidos por estreptozotocina (STZ). Morfina (MPN, 10 mg/kg), diclofenac (DIC, 100 mg/kg) e clorpropamida (250 mg/kg) foram utilizados como fármacos de referência para comparação. O extrato da planta (APE, 50-800 mg/kg) inibiu significativamente ( $P < 0,05-0,001$ ) a inflamação aguda induzida por albumina de ovo fresco e causou hipoglicemia significativa ( $P < 0,05-0,001$ ) relacionada à dose. Hipoglicemia em ratos normais (normoglicêmicos) e diabéticos. Os resultados deste estudo experimental em animais indicam que o extrato aquoso de *H. hemerocallidea* possui propriedades anti-inflamatórias e antidiabéticas e, portanto, dá apoio farmacológico aos usos folclóricos e anedóticos da BA no tratamento de condições inflamatórias artríticas dolorosas, bem como na gestão e controlo do diabetes mellitus tipo 2.

Na Tabela 1.6 encontram-se resumidas algumas das atividades biológicas da BA e dos seus constituintes referidos na literatura.

Tabela 1.6: Actividade biológica dos extratos de *H. hemerocallidea* e dos seus constituintes.

Atividade (Mecanismo de acção/alvo/substância responsável)	Referências
<p>Antitumoral</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Rooperol exerce atividade antimetastática por sua capacidade de estimular a síntese de colagénio tipo I, o que poderia impedir invasões de células tumorais.</li> </ul>	(Albrecht et al., 1995; Bassey et al., 2015; Drewes et al., 2008; Drewes and Liebenberg, 1983; Gaidamashvili and van Staden, 2006; Laporta et al., 2007; Madikizela and McGaw, 2019; Marini-Bettolo et al., 1985; Pegel, 1979)
<p>Antimicrobiana e antifúngica.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Extratos de diclorometano e hexano resultaram em boa inibição contra a COX-1 e a COX-2 devido à presença de saponinas e bufadienolidas nos bulbos. E os extratos etanólicos de <i>E. autumnalis</i> causaram maior inibição que os extratos aquosos quando testados em um ensaio <i>in vitro</i> para inibidores da ciclooxigenase</li> </ul>	(Gaidamashvili and van Staden, 2006; Katerere and Eloff, 2008; Laporta et al., 2007; Steenkamp and Gouws, 2006)
<p>Anti-inflamatória, antinociceptiva, analgésica, antioxidante</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Experiências <i>in vitro</i> mostraram que os extratos etanólicos de <i>H. hemerocallidea</i> exibiram efeitos inibitórios mais altos na COX-1 do que os extratos aquosos, que também relataram inibir levemente a COX-2. Usando o modelo de edema de pata de rato induzido por albumina;</li> <li>Os análogos ocorrem pela inibição da via da 5-lipoxigenase, em vez da ciclooxigenase;</li> <li>O <math>\beta</math>-sitosterol aumenta a expressão e a atividade da atividade do MnSOD e da glutathione peroxidase.</li> </ul>	(Katerere and Eloff, 2008; Laporta et al., 2007; Madikizela and McGaw, 2019; Nair et al., 2007; Ojewole, 2006; Steenkamp et al., 2005; Steenkamp and Gouws, 2006)(van der Merwer et al., 1993)
<p>Antidiabética</p> <p>Extrato aquoso de <i>H. hemerocallidea</i> mostrou capacidade de eliminar HO e causou hipoglicemia relacionada à dose em ratos normais e diabéticos</p>	(Steenkamp and Gouws, 2006)(Ojewole, 2006)
Anticonvulsivante	(Ojewole, 2006)

#### 1.4. Objectivos

Tendo em conta a importância que a batata africana tem no sul da África Austral, particularmente em Moçambique, surgiu o interesse de realizar um estudo que pretende:

- Testar a produção de extratos de *Hypoxis hemerocallidea*, avaliando diferentes solventes (acetona e etanol) e comparando-os com o método de extração tradicional (extração com água fervente);
- Testar a produção de extratos de *Hypoxis hemerocallidea*, utilizando misturas binárias de acetona:água e de etanol:água
- Avaliar o efeito da remoção da pele do corno no rendimento de extração e características dos extratos obtidos.
- Caracterizar os extratos produzidos relativamente aos seus rendimentos de extração, à sua atividade antioxidante (atividade redutora férrica e atividade anti-radicalar em relação ao DPPH), e quanto ao seu teor de compostos fenólicos totais;
- Desenvolver um método simples e confiável de HPLC para detectar os compostos majoritários presentes nos extratos produzidos;
- Relacionar a presença dos compostos detectados com as propriedades funcionais dos extratos de BA;
- Avaliar a digestão gastrointestinal simulada (*in vitro*) dos extratos produzidos.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Matéria-prima

Os cormos utilizados no decorrer deste trabalho correspondem à espécie *Hypoxis hemerocallidea* (Figura 2.1) e tiveram proveniência de Moçambique. Foram transportadas para Portugal e conservadas a temperatura ambiente até ao início dos trabalhos.



Figura 2.1: Amostras de *Hypoxis hemerocallidea* utilizadas neste trabalho.

Todas os cormos foram preparados da mesma forma: Depois de pesados, os cormos foram lavados muito bem em água corrente para remover o excesso do exsudato e limpos com papel, cortados horizontalmente em fatias e posteriormente em cubos de 1cm<sup>3</sup>.

### 2.2. Caracterização da matéria-prima

#### 2.2.1. Determinação do teor de humidade

O teor de humidade da matéria-prima foi determinado segundo uma adaptação do protocolo AOAC (1999) numa estufa (Memmert 854 Schwabach W-Germany), em triplicado. A humidade foi determinada com base na perda de massa da batata a 105 ± 2°C, durante 12 horas. Após secagem, as amostras foram colocadas num exsiccador até temperatura ambiente e pesadas. Este parâmetro representa o teor de água e substâncias voláteis que a amostra perde durante a secagem, expresso em % (m/m) e calculado pela seguinte fórmula:

$$\% \text{Teor de humidade} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_3} \times 100 \dots \dots \dots \text{Equação 2.1}$$



Onde:

$m_1$  é a massa de amostra juntamente com a caixa de Petri (g);  $m_2$  é a massa de amostra seca juntamente com a caixa de Petri (g) e  $m_3$  é a tara da caixa de Petri (g).

### 2.2.2. Determinação do teor de cinzas

A determinação do teor de cinzas foi realizada através do método gravimétrico, de acordo com a referência 935.42 da AOAC (1990). Pesou-se 1 g de amostra (em triplicado) numa balança analítica (Mettler Toledo AB204-S), em cápsulas de porcelana previamente condicionadas em mufla (Naber-therm) a  $550 \pm 50$  °C, durante uma hora e taradas. Posteriormente, colocou-se a cápsula com a amostra na mufla a  $550 \pm 50$  °C durante duas horas, de forma a completar o processo de oxidação da matéria orgânica. Em seguida, as cápsulas contendo as cinzas foram retiradas da mufla, arrefecidas em exsiccador até temperatura ambiente e pesadas em balança analítica. Os resultados foram expressos em % (m/m), a partir da fórmula:

$$\% \text{Teor de cinzas} = \frac{m_1 - m_2}{m_3} \times 100 \dots \text{Equação 2.3}$$

Onde:

$m_1$  é a massa da cápsula com cinza (g);  $m_2$  é a tara da cápsula (g) e  $m_3$  é a massa da amostra (g).

### 2.2.3. Determinação do teor de gordura

A análise do teor de gordura foi realizada utilizando o método 991.36 da AOAC (1999). A análise quantitativa do óleo baseia-se na separação dos lípidos da matriz da amostra por extração com solventes não polares. A extração de gordura foi realizada a partir de 5 g de amostra (em duplicado), utilizando 250 mL de hexano (Carlo Erba), num sistema Soxhlet aquecido numa manta de aquecimento (IBX Instruments Serie HM01), até que o líquido no extrator ficasse transparente. O extrato resultante do processo foi evaporado à secura (Rotavapor Buchi) e pesado em balança analítica (Mettler Toledo AB204-S) de forma a calcular o teor de gordura da amostra, expresso em % (m/m), de acordo com a equação 2.3:

$$\% \text{Teor de gordura} = \frac{m_1 - m_2}{m_3} \times 100 \dots \text{Equação 2.3}$$

Onde:

$m_1$  é a massa do balão com a gordura extraída (g);  $m_2$  é a massa do balão vazio (g) e  $m_3$  é a massa de amostra (g).

#### 2.2.4. Determinação de proteína total

O teor de proteína total na amostra de batata foi determinado com base na norma ISO 5663:1984 (método Kjeldahl). A amostra da batata foi digerida com ácido sulfúrico concentrado (> 95 % v/v, Panreac) na presença de mistura catalisadora (sulfato de potássio + selénio negro), a 360 °C, até apresentar uma coloração transparente. Após a digestão, a solução foi transferida para um balão de vidro de 100 mL e o volume foi aferido com água ultra-pura (MilliQ). Esta solução foi filtrada para um frasco plástico e conservada a 4 °C, até se concluir a análise.

Para a determinação da proteína total, a 25 mL do digerido foram adicionadas 2 gotas de fenolftaleína e o pH da mistura foi ajustado até 8 com hidróxido de sódio aquoso 6 N (LabChem). Esta solução foi de imediato colocada a destilar (Tecator Kjeltex System 1002 Distilling Unit), sendo a fase de vapor recolhida numa solução contendo 50 mL de ácido bórico 2 % e 0,5 mL de solução indicadora de ácido bórico (solução indicadora de vermelho de metilo + solução indicadora de azul de metilo). Após destilação, a solução de ácido bórico contendo  $\text{NH}_4^+$  foi titulada com ácido sulfúrico 0,02 N. A determinação foi realizada em triplicado, tendo o teor de proteína sido calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\%Proteína\ total = \frac{V_1 \times N \times b_1}{V_2 \times m_1} \times 1,4 \times 5,16 \dots \dots \dots \text{Equação 2.4}$$

Onde:

$V_1$  representa o volume de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,02 N gasto na titulação (mL);  $V_2$  representa o volume de amostra digerida utilizada na destilação (mL);  $b_1$  representa o volume final de amostra digerida (mL); N representa a normalidade do titulante (N);  $m_1$  representa a massa de amostra utilizada na digestão (g) e 5,16 é factor de conversão de azoto em proteína.

#### 2.2.5. Hidratos de carbono

O valor dos hidratos de carbono foram determinados por diferença, relativamente às outras determinações de caracterização, de acordo com a equação 2.5:

$$\%Hidratos\ de\ carbono = 100 - \%Humidade - \%Cinzas - \%Gordura - \%Proteína \dots \dots \dots \text{Equação 2.5}$$

#### 2.3. Preparação de extratos

Os extratos de BA foram produzidos com a mesma razão amostra:solvente em todos os ensaios, correspondendo a uma razão 1:10 (25 g de BA e 250 mL de solvente).

Para a preparação dos diferentes extratos foram realizadas diferentes abordagens, de forma a avaliar o seu impacto no rendimento de extração, e nas diferentes análises de caracterização. Assim sendo, as diferentes abordagens na preparação de extratos foram:

- Utilização de diferentes solvente (acetona, etanol e água – método tradicional);
- Utilização de misturas acetona:água (com % de acetona de 100 %, 75 %, 50 %, 25 % e 0 %);
- Utilização de misturas etanol:água (com % de etanol de 100 %, 75 %, 50 %, 25 % e 0 %);
- Preparação de extratos utilizando batata com casca e sem casca;
- Utilização de diferentes amostras de batata na preparação dos extratos;

### **2.3.1. Extrato aquoso (método tradicional)**

Numa proveta foram medidos 250 mL de água quente, que foram vertidos sob 25 g de BA previamente processada como descrito no ponto 2.1. De seguida, a mistura foi homogeneizada com uma tritadora mecânica e colocada sob aquecimento até à ebulição, permanecendo na temperatura de ebulição durante 15 minutos. Após a extração a quente, a mistura foi conservada no escuro durante 12 h, arrefecendo até à temperatura ambiente, e após esse período o extrato foi separado do resíduo por filtração por pano de algodão. O volume foi aferido a 250 mL e o extrato foi colocado a 4 °C durante 12 h. Após esse período o extrato foi filtrado por papel de filtro para remover algum material precipitado durante a conservação no frio e transferido para frasco que foi reservado no frio (a 4 °C ou -10 °C, conforme o período de conservação).

### **2.3.2. Extratos de etanol e acetona**

Os extratos de etanol e de acetona, bem como das misturas de acetona:água ou etanol:água, foram produzidos a frio, por maceração durante 24 h no escuro. Numa proveta foram medidos 125 mL do solvente de extração, que foram vertidos sob 25 g de corno previamente processado como descrito no ponto 2.1. De seguida, a mistura foi homogeneizada com uma tritadora mecânica e colocada no escuro à temperatura ambiente durante 12h. Após esse período o extrato foi filtrado e o resíduo foi ressuspensão em 125 mL de solvente de extração novo. Esta mistura foi de novo macerada no escuro durante 12 h seguindo-se a filtração do 2º extrato por pano de algodão. Os extratos foram combinados, o volume foi aferido a 250 mL e colocados a 4 °C durante 12 h. Após esse período os extratos foram filtrados por papel de filtro para remover algum material precipitado durante a conservação no frio e transferidos para frascos que foram reservados no frio (a 4 °C ou -10 °C, conforme o período de conservação).

## 2.4. Caracterização dos extratos de cormos de *H. hemerocallidea*

### 2.4.1. Determinação do rendimento de extração

Os rendimentos de extração foram determinados por gravimetria, retirando uma alíquota de extrato (de volume conhecido) e eliminado o solvente sob vácuo (Rotavapor Buchi), em balão de fundo redondo previamente tarado. Os cálculos para o rendimento foram realizados de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{m_{\text{extrato}}}{m_{\text{amostra}}} \times 100 \dots\dots\dots \text{Equação 2.6}$$

Onde:

$m_{\text{extrato}}$  representa a massa de extrato obtida depois da evaporação (g) e  $m_{\text{amostra}}$  representa a massa de amostra usada no processo de extração (g).

### 2.4.2. Determinação do teor de compostos fenólicos totais - Método de Folin-Ciocalteu

O conteúdo fenólico dos extratos de *H. hemerocallidea* foi determinado usando o ensaio Folin-Ciocalteu, de acordo com uma adaptação do método descrito por Singleton e colaboradores (1998). A mistura da reação consistiu em 0,5 mL da amostra previamente diluída, 2 mL água destilada, 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu e 2 mL de uma solução de carbonato de sódio a 10 % m/V. As misturas da reação foram brevemente agitadas no vórtex (Heidolph) e incubadas no escuro, à temperatura ambiente por 60 minutos. A absorvância foi medida a 760 nm, usando um espectrofotômetro UV/Vis (Pharmacia LKB-Novaspec II). Uma curva padrão de ácido gálico foi usada para converter as leituras de absorvância medidas em concentrações, expressas em mg equivalentes de ácido gálico (EAG). As determinações foram realizadas em triplicado, sendo os resultados expressos em mg EAG, por litro de extrato, por grama de extrato ou por grama de batata (Figura 2.2).

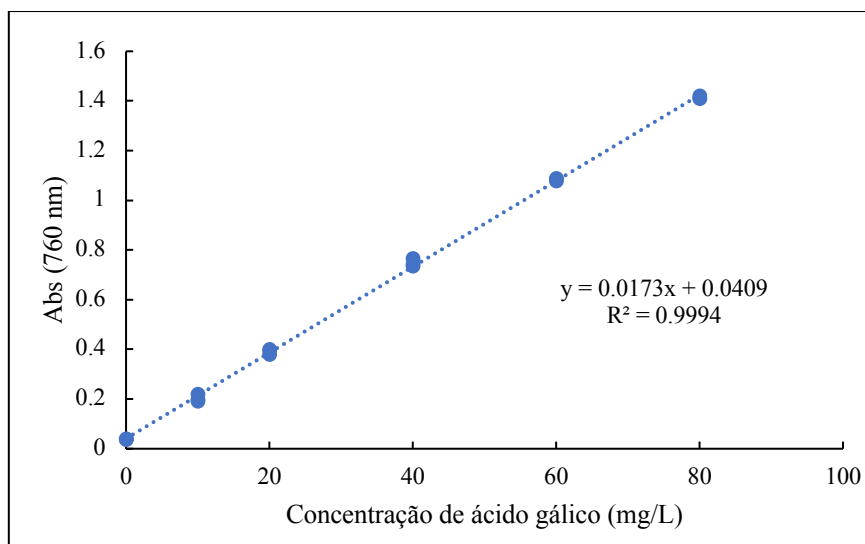


Figura 2.2: Exemplo da curva de calibração utilizada na determinação do teor de compostos fenólicos totais.

### 2.4.3. Determinação da atividade antioxidante – DPPH

O ensaio de DPPH foi utilizado para examinar a atividade sequestradora de radicais livres. O potencial antioxidante dos extratos de BA foi conduzido usando o ensaio DPPH como descrito por Karioti e colaboradores (2004). As amostras foram previamente diluídas, e a tubos de ensaio foram adicionados 0,5 mL da amostra e 3,5 mL de solução metanólica de DPPH (45 mg/L). As misturas reacionais foram misturadas em vortex (Heidolph) e incubadas no escuro à temperatura ambiente por 30 minutos. As determinações foram realizadas em triplicado.

A descoloração da cor púrpura na mistura de reação como resultado do branqueamento da cor da solução de DPPH foi medida usando um espectrofotômetro UV/Vis (Pharmacia LKB-Novaspec II) a 517 nm.

A curva de calibração foi preparada substituindo a amostra por concentrações diferentes de padrão Trolox<sup>®</sup> (97%, Acros Organics), variando as concentrações de padrão entre 10 mg/L e 80 mg/L (Figura 2.3).

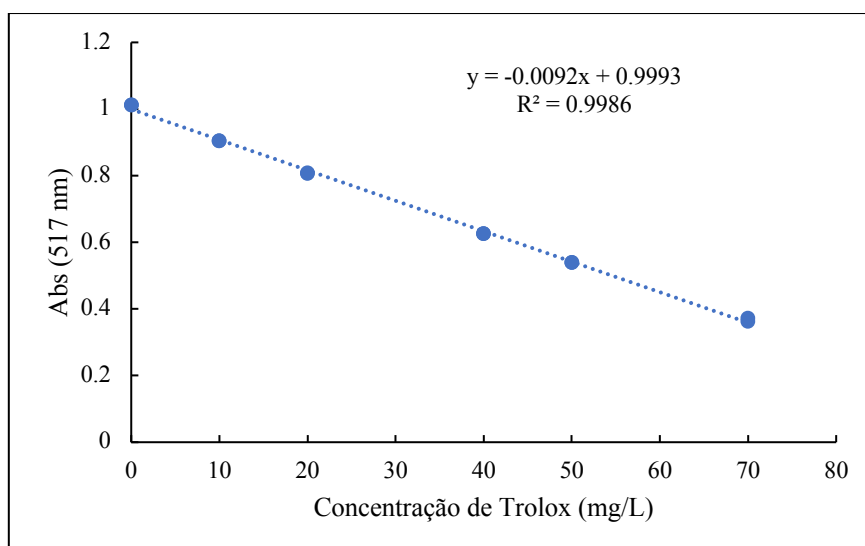


Figura 2.3: Exemplo da curva de calibração para a determinação de atividade anti-radicalar (DPPH).

A atividade antioxidante também pode ser expressa em termos de percentagem de inibição relacionada a uma dada concentração de amostra, de acordo com a equação 2.7:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{Abs_{branco} - Abs_{amostra}}{Abs_{branco}} \times 100 \dots \text{Equação 2.7}$$

Onde:

$Abs_{branco}$  representa a absorvância lida a 517 nm para o branco e  $Abs_{amostra}$  representa a absorvância lida a 517 nm para cada amostra.

#### 2.4.4. Determinação da atividade antioxidante de redução do Fe (III) a Fe (II) – FRAP

O ensaio FRAP (*Ferric Reduction Antioxidant Power*) determina a capacidade antioxidante da amostra através da determinação do seu poder para reduzir o Fe (III) a Fe (II). Quando o Fe (III) do complexo de Fe(III)- tripiriditriazina ( $Fe^{3+}$ -TPTZ) é reduzido a Fe (II) forma-se, em meio ácido, uma intensa coloração azul, de forma a manter a solubilidade do ferro. Para a realização do ensaio FRAP seguiu-se uma adaptação do método descrito por Wong e colaboradores (2006). Assim, num tubo de ensaio adicionou-se 100  $\mu$ L de cada uma das amostras (previamente diluídas) e 3 mL de reagente FRAP, preparado de acordo com a tabela seguinte:

Tabela 2.1: Composição do reagente FRAP.

Reagente	Quantidade
Tampão acetato 0,25 M pH 3,6	250 mL
TPTZ 10 mM em HCl 40 mM	25 mL
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 20 mM	25 mL

Os tubos foram incubados 15 minutos a 37 °C. Durante esta incubação foi possível visualizar o aparecimento de uma coloração azul, cuja intensidade variava entre as várias amostras, e que foi quantificada por leitura da absorvância a 593 nm num espectrofotómetro (SPEKOL 1500).

As amostras foram analisadas em triplicado, tendo a atividade antioxidante sido determinada através de uma curva de calibração, preparada da forma já descrita, mas substituindo as amostras por soluções padrão de sulfato ferroso com concentrações entre os 0 e os 1,25 mM (Figura 2.4). Os resultados foram expressos em mmol de  $\text{Fe}^{2+}/\text{L}$ .

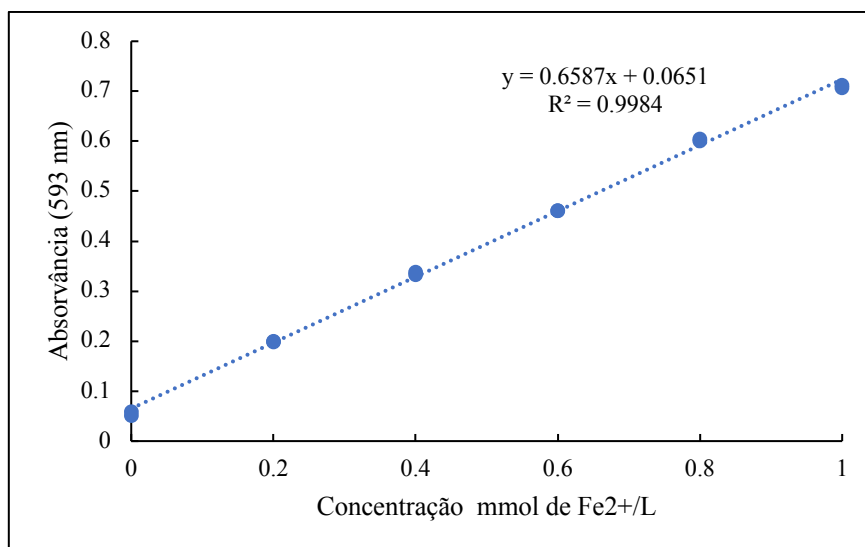


Figura 2.4: Curva de calibração utilizada nos ensaios de FRAP.

#### 2.4.5. Determinação do teor de açúcares redutores

A determinação do teor de açúcares redutores foi realizada para os extratos do corno B3 (método tradicional, extração com acetona e extração com etanol). Esta análise foi realizada com base no método do reagente de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), descrita por Miller (Miller, 1959). O reagente DNS foi preparado dissolvendo em 1 L de água destilada 10 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico (Sigma), 16 g de hidróxido de sódio (JMS Lda) e 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio (Scharlau). A solução foi posteriormente filtrada e conservada em frasco escuro.

Em tubos de ensaio foram colocados 0,5 mL da amostra (previamente diluída) e 0,5 mL de reagente DNS. As misturas foram homogeneizadas em vórtex (Heidolph) e incubadas em banho termostaticado a 100 °C por 5 minutos. Após o banho, as amostras foram arrefecidas a temperatura ambiente e a cada tubo de ensaio adicionou-se 5 mL de água destilada. As amostras foram lidas num espectrofotómetro (Pharmacia LKB-NovaspecII) a 540 nm.

A concentração de açúcares redutores foi determinada através de uma curva de calibração previamente preparada, com padrões de D-glucose (LabChem) entre 50 e 1500 mg/L, preparados por diluição a partir de uma solução-mãe com concentração de 1 g/L (Figura 2.5).

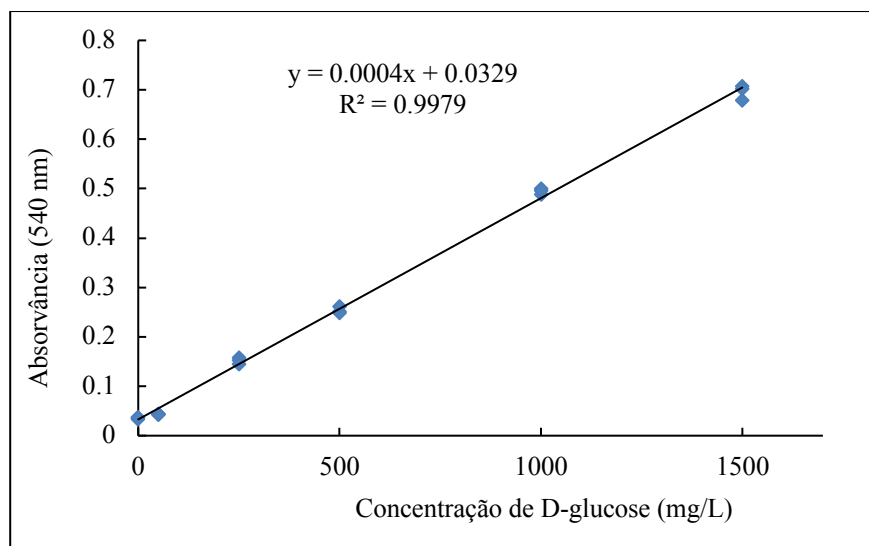


Figura 2.5: Curva de calibração utilizada para a determinação de açúcares redutores pelo método DNS.

## 2.5. Análise dos compostos presentes nos extratos da batata africana por HPLC-DAD

Para a realização desta parte do trabalho experimental, foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta pressão (Spectra System) equipado com uma bomba binária de gradiente (Spectra System P2000), amostrador automático (Spectra System AS1000), detetor de díodos (Spectra System UV6000LP) e controlador UV (Spectra System SN4000). A separação cromatográfica realizou-se numa coluna monolítica RP-18e, 100 mm (Ref<sup>o</sup> 1.02129.0001, Chromolith Performance), com diâmetro de partícula de 5 µm e comprimento de 15 cm.

Antes de proceder à análise cromatográfica, alíquotas dos extratos produzidos foram diluídos numa proporção 1:10 numa solução aquosa de 0,5 % ácido fórmico (Panreac).

O solvente foi programado entre 100% de ácido fórmico aquoso (0,5 %) até 100 % de acetonitrilo de forma a otimizar a separação cromatográfica para um tempo total de análise de 110 minutos.

A metodologia cromatográfica aplicada neste trabalho, teve como base outros trabalhos realizados em HPLC-DAD no Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa da FCT/UNL, e os compostos foram identificados de forma tentativa através de comparações de espectros encontrados na literatura.

## 2.6. Digestão gastrointestinal simulada de um extrato de BA selecionado

### 2.6.1 Digestão gástrica

A digestão gástrica foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Briones-Labarca e colaboradores (2011). Em frascos contendo 20 mL dos extratos produzidos com acetona, etanol e método tradicional de um dos cormos em estudo (corno B3), ajustou-se o pH a 2 com uma solução de HCL 1 M. Em seguida adicionou-se 1 mL de uma solução de pepsina (50 mg/mL em HCL 0,1 N) por cada mL de amostra. As amostras foram incubadas ao abrigo da luz, durante duas horas, com agitação de



100 rpm e a 37 °C. Após o tempo de incubação, as amostras foram colocadas em gelo e foram centrifugadas a 11 000 rpm, durante 30 minutos e a 4 °C (Sigma 4K-15). Posteriormente, as amostras foram filtradas (Millipore Millex GP, 0,22 µm), e reservadas no frio até realização de análises posteriores. Em simultâneo, realizou-se também um ensaio controlo (branco da digestão gástrica), em que se substituiu a amostra por igual volume de água ultrapura, tendo o restante procedimento sido exatamente idêntico ao descrito para as amostras.

### **2.6.2 Digestão intestinal**

Para a digestão intestinal adoptou-se também o protocolo descrito por Briones-Labarca e colaboradores (2011). As amostras foram preparadas conforme o descrito no ponto anterior para a preparação da digestão intestinal. No entanto, após a incubação com pepsina, acertou-se o pH das amostras a  $\pm$  2,04 com uma solução de NaHCO<sub>3</sub> 1 M e adicionaram-se 5 mL de uma solução de pancreatina e bÍlis (2 g/L de pancreatina e 12 g/L de bÍlis em NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M). As amostras foram novamente incubadas ao abrigo da luz, durante duas horas, com uma agitação de 60 rpm e à temperatura de 37 °C. Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 11 000 rpm, 30 minutos e a 4 °C (Sigma 4K-15). Posteriormente, as amostras foram filtradas (Millipore Millex GP, 0,22 µm), e reservadas no frio até realização de análises posteriores. Em simultâneo, realizou-se também um ensaio controlo (branco da digestão gastrointestinal), em que se substituiu a amostra por igual volume de água ultrapura, tendo o restante procedimento sido exatamente idêntico ao descrito para as amostras da digestão intestinal.

### **2.6.3. Análise dos digeridos**

Após o procedimento de digestão intestinal, os digeridos resultantes foram analisados relativamente ao seu teor de fenólicos totais (de acordo com a metodologia descrita no ponto 2.4.2), à sua atividade anti-radicalar (de acordo com a metodologia descrita no ponto 2.4.3) e foi também realizada a análise dos compostos presentes nos digeridos por HPLC-DAD (de forma análoga à descrita no ponto 2.5.).

### 3. Resultados e Discussão

Este trabalho teve como princípio a caracterização de amostras de batata africana (*Hypoxis hemerocallidea*) e do seu potencial como fonte de extratos bioativos.

Em particular foi efetuada a caracterização da matéria-prima utilizada, foi testada a extração de compostos bioativos utilizando diferentes solventes hidrofílicos e suas misturas com água.

A composição dos extratos foi avaliada por HPLC-DAD e as suas propriedades funcionais foram estudadas por três métodos colorimétricos: o teor de fenóis totais pela reação de Folin-Ciocalteu, a atividade antioxidante de redução férrica (FRAP) e a atividade anti-radicalar relativa ao DPPH.

#### 3.1. Caracterização da matéria-prima

A caracterização desta amostra envolveu determinações de teores de humidade, cinzas, gordura, proteína total e hidratos de carbono (perfil nutricional). Na Tabela 3.1 apresentam-se os resultados obtidos (média  $\pm$  desvio padrão,  $n=3$ ) para os principais componentes nutricionais dos cormos de *Hypoxis hemerocallidea*.

Tabela 3.1: Composição dos cormos de *Hypoxis hemerocallidea*.

Parâmetros	Valor em base húmida	Valor em base seca
Teor de humidade (%)	$36,30 \pm 0,02$	-
Teor de cinzas (%)	$4,60 \pm 0,07$	$7,20 \pm 0,01$
Teor de gordura (%)	$0,60 \pm 0,02$	$0,90 \pm 0,04$
Proteína total (%)	$4,40 \pm 0,00$	$6,90 \pm 0,00$
Hidratos de carbono (%)	$54,20 \pm 0,10$	$85,10 \pm 0,10$

De acordo com os dados demonstrados na Tabela 3.1, podemos constatar que os cormos de *Hypoxis hemerocallidea* apresentam um valor de humidade baixa ( $36,30 \pm 0,02$ ) e de hidratos de carbono relativamente acima ( $54,20 \pm 0,10$ ) em relação aos demais tubérculos. Estes cormos podem ser comparados com o inhame, onde a relação do teor de humidade está em torno de 65,62 % e o conteúdo de hidratos de carbono em 29,50 %. Foram encontrados valores próximos para as demais representações nutricionais como cinzas, gordura e proteína total para a *H. hemerocallidea* também em comparação com o inhame. O valor da proteína total de *H. hemerocallidea* apresenta um valor de 4,40 %, de gordura ( $0,60 \pm 0,02$ ) e de cinzas ( $4,60 \pm 0,07$ ), sendo que para o inhame foi determinado um valor de teor de gordura mais baixo, com cerca de 0,86 % e de proteína total de 3,06 % (Brito et al., 2011).

Oliveira e colaboradores (2013) verificaram resultados superiores da composição nutricional da batata doce comparativamente ao de *H. hemerocallidea* onde observaram uma humidade média de  $7,05 \pm$

0,16 %, de cinzas  $2,88 \pm 0,22$  %, proteínas de  $5,48 \pm 0,41$  %, gordura de  $0,60 \pm 0,12$  % e de carboidratos de  $65,18 \pm 1,47$  %.

Em relação aos valores da base seca para a análise nutricional de *H. hemerocallidea*, podemos observar uma diferença significativa entre os valores de cinzas ( $7,20 \pm 0,01$  %) e de hidratos de carbono ( $85,10 \pm 0,10$  %) em relação aos valores representados na base húmida. Analisando os valores da base seca, é importante destacar o maior teor de matéria seca do ponto de vista industrial, pois resulta de maior rendimento do processo e menor quantidade de água residual.

### 3.2. Rendimentos de extração

Na Tabela 3.2 apresentam-se os rendimentos mássicos (expressos em % numa base húmida,  $n=2$ ) das extrações realizadas a partir de diferentes cormos de *Hypoxis hemerocallidea* utilizando diferentes solventes (acetona, etanol e água fervente).

Tabela 3.2: Rendimento de extração ( $\eta$ ) a partir de diferentes cormos de *Hypoxis hemerocallidea* extraídos com diferentes solventes (acetona, etanol e água fervente)

Solvente: Acetona		Solvente: Etanol		Solvente: H <sub>2</sub> O <sub>quente</sub>	
Código da amostra	$\eta$ (% m/m)	Código da amostra	$\eta$ (% m/m)	Código da amostra	$\eta$ (% m/m)
B1-ACE	27,8	B1-ET	16,3	B1-H <sub>2</sub> Oq	14,0
B3-ACE	23,9	B2-100%ET	27,6	B3-H <sub>2</sub> Oq	17,9
B6-ACE-SC1	14,3	B3-ET	23,1	B5-H <sub>2</sub> Oq	25,3
B6-ACE-SC2	14,2	B6-ET-SC1	14,4	B6-H <sub>2</sub> Oq-SC1	14,4
B10-ACE	14,2	B6-ET-SC2	14,3	B6-H <sub>2</sub> Oq-SC2	13,7
B11-100%ACE	17,8	B10-ET	15,0	B12-100%H <sub>2</sub> Oq	14,1
<b>Média</b>	<b>18,7</b>	<b>Média</b>	<b>18,5</b>	<b>Média</b>	<b>16,6</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>5,8</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>5,6</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>4,6</b>
B10-ACE-Cascas	14,8				

Os rendimentos de extração dos extratos obtidos com acetona, etanol e água fervente foram comparáveis para a maior parte das amostras e o coeficiente de variação de cada determinação foi inferior a 2 %.

Para os cormos B1 e B3, os extratos aquosos pareceram ter um peso seco significativamente inferior aos extratos obtidos com água fervente a partir das mesmas amostras, mas no caso do cormo B6 os rendimentos de extração foram comparáveis para os três solventes.

Através do cálculo da média e desvio-padrão do rendimento de extração entre diferentes cormos com o mesmo solvente observamos que as médias para o etanol e a acetona são comparáveis e apesar da média obtida para os extratos de água ser ligeiramente inferior (16,6 %) a sua diferença para, por exemplo, o extrato de acetona ( $18,7 - 16,6 = 2,1$  %) é inferior ao desvio-padrão para os diferentes cormos

o que confirma que as principais diferenças observadas no rendimento de extração parecem estar relacionadas com o próprio corno e não com o solvente utilizado.

Estas diferenças de rendimento de corno para corno podem dever-se às suas diferentes composições que decorrem do seu estado fisiológico e que afetam as concentrações dos componentes principais bem como o teor de água a as concentrações de metabolitos secundários como os compostos fenólicos.

Sendo a acetona e o etanol solventes hidrofílicos têm a capacidade de dissolver completamente a água presente na amostra. Assim se o corno tiver um maior teor de água, esta água de vegetação vai dissolver-se no solvente de extração, alterando a sua composição e a sua capacidade de remover componentes do corno.

Por outro lado, o grau de maturidade da planta e dos respetivos cornos afetam a sua produção de metabolitos secundários como os ácidos orgânicos e os compostos fenólicos que depois podem ser dissolvidos afetando o rendimento observado. Segundo Ncube e colaboradores (2013), esse fenómeno pode ser explicado pelo facto de que na primavera, o material vegetativo começa a se desenvolver e que os tecidos imaturos de plantas produzem mais compostos fenólicos, especialmente taninos, em comparação com tecidos velhos e maduros.

Assim, o fator que mais afetou o rendimento mássico foi a natureza da amostra, pelo que se decidiu realizar um conjunto de ensaios nos quais se utilizou um mesmo corno cuja massa era suficientemente grande para permitir a divisão em sub-amostras para teste da influência da natureza do solvente no rendimento de extração.

Apresentam-se na Tabela 3.3 os rendimentos de extração para os ensaios realizados a partir de um único corno, utilizando misturas binárias de acetona:água (corno B3) ou de etanol:água (corno B2).

Tabela 3.3: Influência da percentagem de solvente orgânico no solvente de extração e da remoção da pele do corno de *Hypoxis hemerocallidea* no rendimento de extração.

Código da amostra	$\eta$ (% m/m)	Código da amostra	H (% m/m)
Variação da % de etanol		Variação do solvente e da remoção da pele do corno	
B2-100%ET	27,6	B6-ACE-CC1	13,5
B2-75%ET	25,8	B6-ACE-CC2	13,6
B2-50%ET	24,5	B6-ACE-SC1	14,3
B2-25%ET	23,2	B6-ACE-SC2	14,2
Variação da % de acetona		B6-ET-CC1	15,0
B11-100%ACE	17,8	B6-ET-CC2	14,6
B11-75%ACE	19,4	B6-ET-SC1	14,4
B11-50%ACE	21,2	B6-ET-SC2	14,3
B11-25%ACE	22,1	B6-H <sub>2</sub> Oq-CC1	13,7
B11-100%H <sub>2</sub> O	5,5	B6-H <sub>2</sub> Oq-CC2	14,7
		B6-H <sub>2</sub> Oq-SC1	14,4
		B6-H <sub>2</sub> Oq-SC2	13,7

Efetuuou-se ainda uma série de extrações a partir do corno B6, nas quais se comparou o rendimento de extração de 100% acetona, 100% etanol e água fervente a partir de corno com ou sem pele.

O rendimento de extração a partir do corno B2 pareceu aumentar com a percentagem de etanol incluindo para a percentagem de 100 % de etanol. Esta observação é coerente com o facto de os compostos fenólicos serem tipicamente extraídos com misturas de etanol: água ou metanol: água, com percentagens de álcool superiores a 50%.

Na realidade mesmo quando a extração foi efetuada com 100% etanol ou 100% acetona, existiram quantidades relevantes de água no solvente de extração que corresponderam à água de vegetação.

Já no caso da extração com misturas binárias de água:acetona a partir do corno B11, o rendimento de extração variou entre 17,8% e 22,1% mas a diminuição da quantidade de acetona favoreceu ligeiramente o rendimento de extração. No entanto, quando a extração foi realizada com 100% água a frio (por maceração) o rendimento baixou acentuadamente o que indica que a presença de algum solvente orgânico ou a temperatura favorecem a extração de analitos.

A presença ou ausência da pele no corno B6 não afetou o rendimento de extração pois o desvio padrão entre replicados foi da mesma ordem que as diferenças entre amostras com e sem casca. Esta observação é interessante pois sugere que a extração pode ser feita a partir de cormos triturados com pele, apenas limpos de detritos e restos de raízes o que simplifica o processo de pré-tratamento da amostra.

Assim analisando o conjunto de resultados obtidos para o rendimento de extração para diferentes cormos e diferentes solventes (Figura 3.1) observamos que em média este parâmetro se situou em torno

dos 15% da massa do corno, destacando-se algumas amostras como o corno B3 com rendimentos de extrato superiores a 20% quer para o etanol como para a acetona, o corno B1 para a extração com acetona ou o corno B5 para a extração com água.

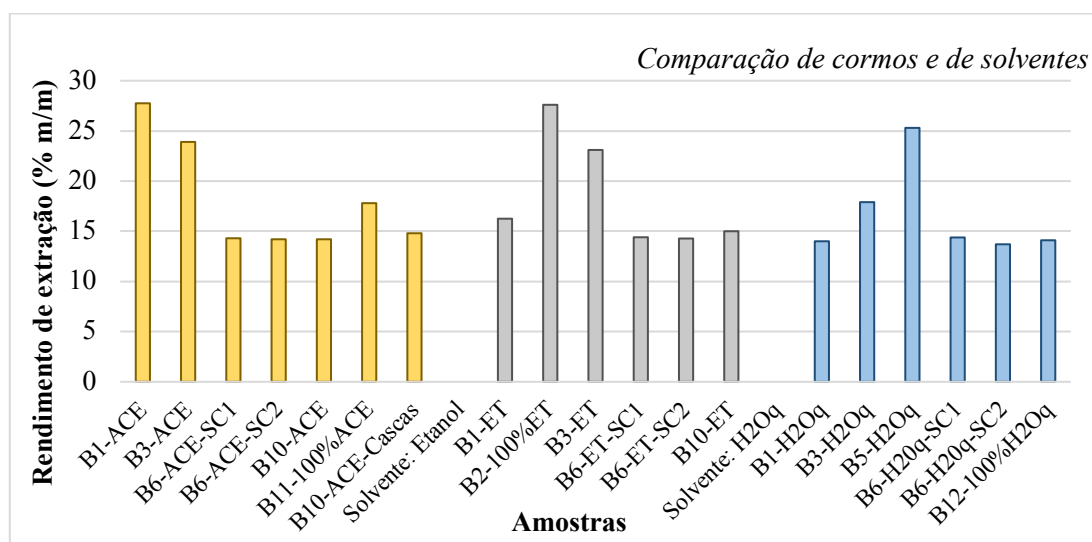


Figura 3.1: Rendimento de extração a partir de diferentes cormos de *Hypoxis hemerocallidea* extraídos com diferentes solventes (acetona, etanol e água fervente)

Comparando os rendimentos de extração obtidos com os cormos B2, B11 e B6 (Figura 3.2) é patente a variação regular com a variação da percentagem de etanol ou acetona e a uniformidade dos rendimentos dos extratos obtidos a partir do corno B6.

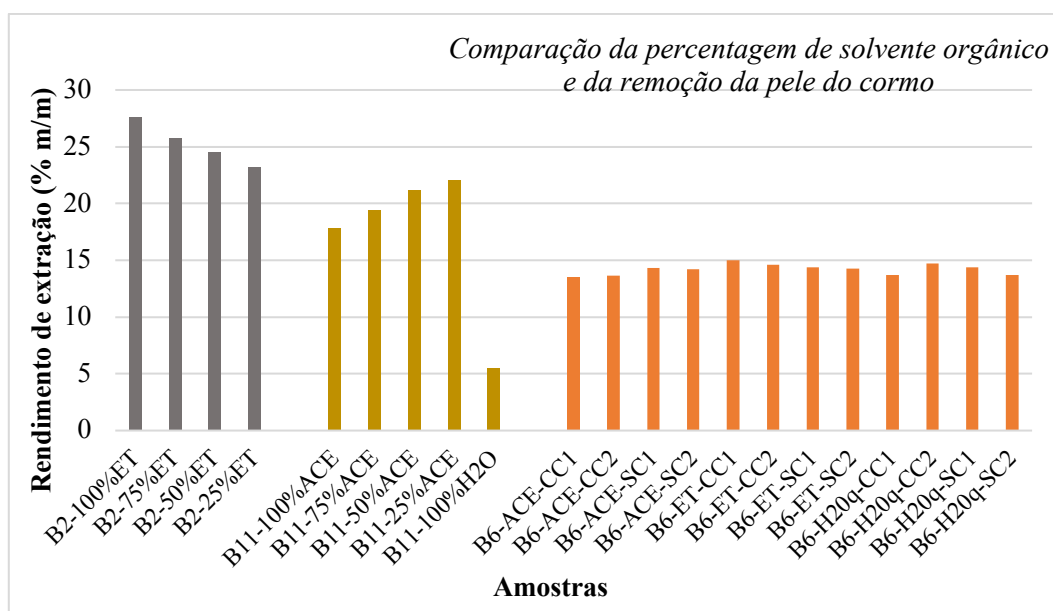


Figura 3.2: Influência da percentagem de solvente orgânico no solvente de extração e da remoção da pele do corno de *Hypoxis hemerocallidea* no rendimento de extração.

No entanto os extratos obtidos a partir dos cormos B2 e B11 com respetivamente etanol e acetona atingiram rendimentos superiores a 20% o que pode ser uma característica destes cormos ou indicar que as misturas binárias podem resultar em extrações mais eficientes do que os solventes puros.

Por outro lado, o rendimento não reflete necessariamente a eficiência de extração de compostos bioativos pois sobretudo a partir de matrizes ricas em carboidratos como é o caso a co-extração de açúcares também contribui para o rendimento mássico sem beneficiar as propriedades funcionais dos extratos.

Assim a caracterização dos extratos quanto ao seu teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante é essencial para avaliar as suas propriedades funcionais e identificar as condições de extração mais adequadas.

### **3.3. Caracterização dos extratos**

#### **3.3.1. Fenólicos totais, atividade redutora férrica e atividade antiradicalar de extratos de *H. hemerocallidea* obtidos a partir de diferentes cormos com diferentes solventes (acetona, etanol e água fervente)**

O teor de fenóis totais, (expresso em mg/L de extrato líquido e em mg/g de extrato seco) dos extratos de *Hypoxis hemerocallidea* obtidos a partir de diferentes cormos com diferentes solventes (acetona, etanol e água fervente) são apresentados na Figura 3.3.

Este parâmetro variou de 4,9 a 6,4 g EAG/L e de 234 a 416 mg EAG/g de extrato, para os extratos de acetona, mas as concentrações mais elevadas no extrato seco não coincidiram com as concentrações mais elevadas em solução, o que reflete a presença de outros compostos em solução que contribuem para o peso seco mas que não são compostos fenólicos.

Os açúcares simples, ácidos orgânicos e aminoácidos livres são componentes que podem contribuir para este efeito dada a sua solubilidade nos solventes usados. Os teores de açúcares redutores determinados para os extratos obtidos a partir do corno B3 foram de  $126 \pm 2$ ,  $113 \pm 2$  e  $138 \pm 2$  mg de glucose/L respetivamente para os extratos de acetona, etanol e água fervente.

Esta hipótese é reforçada pela observação de que a concentração de fenóis no extrato seco foi ligeiramente inferior para os extratos obtidos a partir dos cormos B1 e B3 que apresentaram os maiores rendimentos mássicos, de entre o grupo de cormos extraídos com 100% acetona.

No caso dos extratos obtidos com etanol observou-se uma variação do teor de fenólicos totais entre 4,9 e 11,7 g EAG/L e entre 251 e 488 mg EAG/g de extrato, valores comparáveis com os obtidos com acetona.

Também no caso do etanol se observam diferenças na variação do teor de fenóis em solução e nessa variação no extrato seco refletindo a presença de espécies não fenólicas.

O conteúdo de alguns compostos fenólicos e suas alterações sazonais determinadas apontam o fato de existir uma conexão entre suas diferentes funções em diferentes plantas e os estímulos que desencadeiam a síntese e resultados obtidos mostram que cada grupo fenólico é caracterizado por um padrão de flutuações sazonais nas concentrações (Ncube et al., 2013).

No entanto, no caso do corno B2 extraído com etanol observa-se que a concentração de fenóis é elevada em solução e no extrato seco, correspondendo também este extrato a um peso seco elevado.

Estes resultados sugerem que o corno B2 era efetivamente mais rico em compostos fenólicos do que os restantes e que o seu estado de maturidade não favorecia a presença de compostos como açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos disponíveis para a extração. Assim o valor elevado do peso seco corresponde a uma maior presença de fenóis no extrato líquido e que se reflete depois também no extrato seco.

Já no caso dos cornos B3 e B1, os seus extratos etanólicos têm diferentes pesos secos (ao contrário do que aconteceu nos extratos de acetona) e a concentração de fenóis totais nos extratos secos variaram de forma inversa com o rendimento de extração o que como foi referido sugere a extração de componentes não fenólicos.

Comparando os valores de fenóis nos extratos de acetona e de etanol para os cornos extraídos com ambos os solventes (B1, B3 B6 e B10) não se encontraram diferenças significativas.



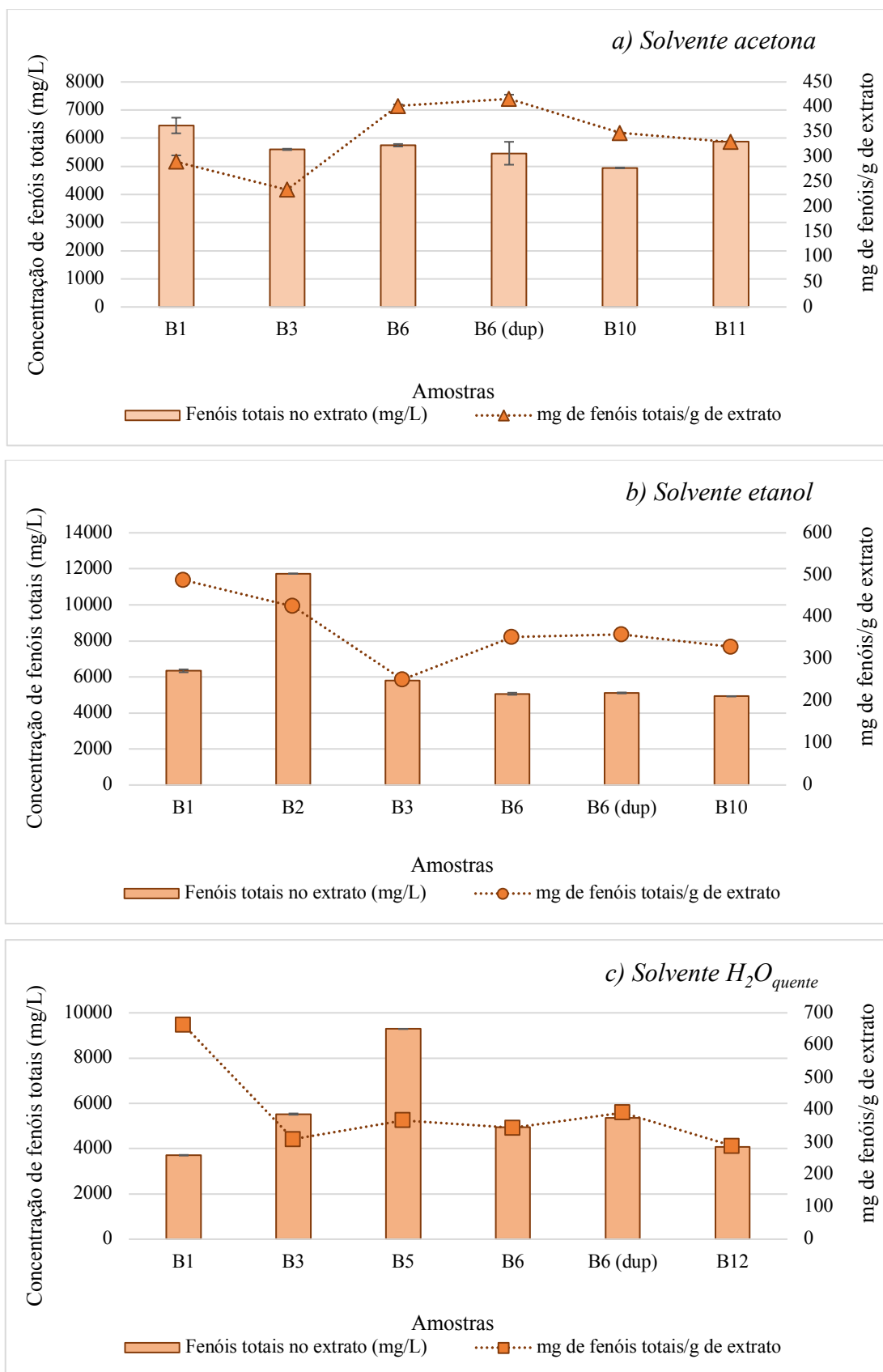


Figura 3.3: Teor de fenóis totais em extratos de *Hypoxis hemerocallidea* obtidos a partir de diferentes cormos extraídos por maceração com a) acetona, b) etanol e c) água fervente (método tradicional).

Para os extratos obtidos com água fervente obtiveram-se valores de fenóis totais de 3,7 a 9,3 g EAG/L e de 288 a 662 mg/g de extrato.

No caso dos extratos aquosos destaca-se o extrato B1 cuja concentração de fenóis no extrato é bastante superior aos dos restantes extratos tal como já tinha sido observado para o extrato de etanol obtido a partir deste corno. Também no extrato aquoso do corno B1, o rendimento mássico foi relativamente baixo o que sugere que este valor elevado de fenóis no extrato seco resulta da sua extração seletiva nestas condições.

Já no caso do corno B5, o elevado teor de fenóis no extrato líquido não se reflete no extrato seco e o rendimento elevado sugere co-extração de componentes não fenólicos.

Estes resultados reforçam a necessidade de se explorar este aspeto da influência do estado fisiológico e maturidade das plantas e dos respetivos cormos na eficiência de extração e na presença de co-extrativos pois este parece ser um fator determinante na obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos e menos ricos em compostos não funcionais como os açúcares ou ácidos orgânicos.

O valor médio da concentração de compostos fenólicos nos extratos aquosos para os cormos extraídos com ambos os solventes (B1, B3 e B6) foram comparáveis o que sugere que os compostos fenólicos extraídos poderão estar predominantemente na forma de derivados glicosídicos que são igualmente solúveis nos solventes utilizados.

Noutras matrizes ricas em compostos fenólicos presentes numa forma não ligada a um açúcar (aglicona) observa-se uma maior eficiência de extração de compostos fenólicos quando se utilizam solventes orgânicos hidrofílicos como acetona ou álcoois do que na extração com água (Cottica et al., 2015).

Por outro lado, os valores elevados dos fenóis recuperados nos extratos aquosos evidenciam a sua estabilidade térmica uma vez que estes extratos são obtidos por contacto com água fervente durante 30 min, seguidos de maceração durante 12 h enquanto os extratos de acetona e etanol são obtidos por maceração durante 12 h à temperatura ambiente.

Esta diferença nos procedimentos de extração utilizados na preparação dos extratos deveu-se à necessidade de comparar o procedimento tradicional (extração a quente com água) com um procedimento alternativo (extração a frio por maceração em solventes orgânicos hidrofílicos e suas misturas com água). A água é um solvente mais “amigo do ambiente”, e mais compatível com produtos alimentares permitindo que não haja preocupações com resíduos de solventes nos extratos, no entanto os extratos aquosos são muito mais suscetíveis à contaminação e proliferação microbiana durante a etapa de preparação, do que os extratos de solventes orgânicos ou com percentagens elevadas destes solventes.

A atividade antioxidante de redução férrica de extratos de *Hypoxis hemerocallidea* obtidos a partir de diferentes cormos extraídos por maceração com a) acetona, b) etanol e c) água fervente (método tradicional) é apresentada na Figura 3.4.

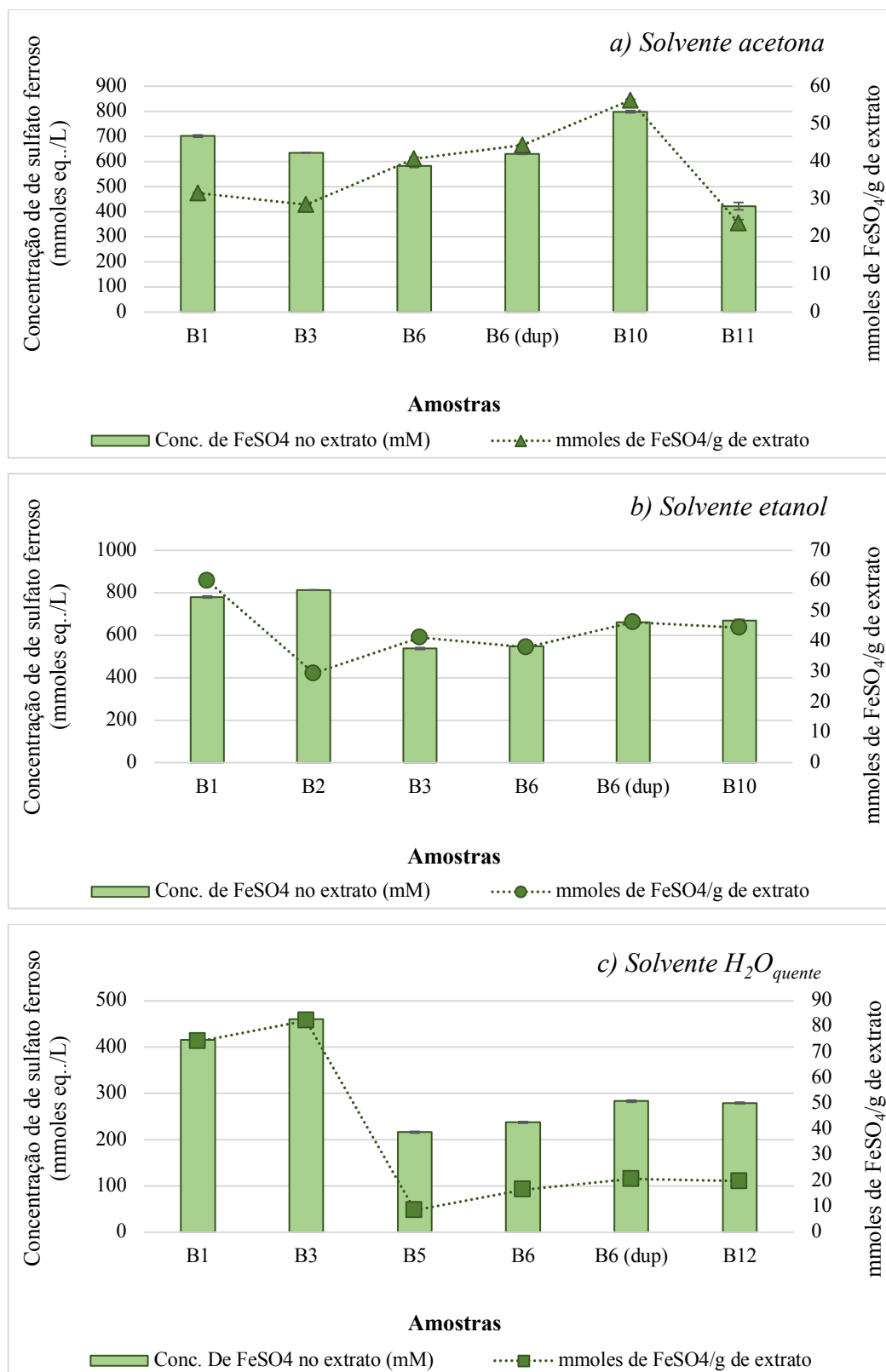


Figura 3.4: Atividade antioxidante de redução fêrrica de extratos de *Hypoxis hemerocallidea* obtidos a partir de diferentes cormos extraídos por maceração com a) acetona, b) etanol e c) água fervente (método tradicional).

A atividade antioxidante de redução férrica de extratos de *Hypoxis hemerocallidea* obtidos a partir de diferentes cormos variou de 422 a 799 mmoles de  $\text{FeSO}_4/\text{L}$  e de 23,7 a 56,2 mmoles de  $\text{FeSO}_4/\text{g}$  de extrato seco, para os extratos obtidos com acetona, de 537 a 813 mmoles de  $\text{FeSO}_4/\text{L}$  e de 29,5 a 60 mmoles de  $\text{FeSO}_4/\text{g}$  de extrato seco para os extratos obtidos com etanol e de 216 a 461 mmoles de  $\text{FeSO}_4/\text{L}$  e de 8,5 a 82,3 mmoles de  $\text{FeSO}_4/\text{g}$  de extrato seco c) água fervente (método tradicional).

Como se pode observar na Figura 3.4 parece ter havido uma maior correspondência entre a atividade de redução férrica expressa em termos de extrato líquido (mmoles de  $\text{FeSO}_4/\text{L}$  de solução) e a mesma atividade expressa em termos de extrato seco (mmoles de  $\text{FeSO}_4/\text{g}$  de extrato) o que pode ser devido a menores interferências positivas de açúcares que são menos reativos com este reagente do que com o reagente de Folin-Ciocalteu (Granato et al., 2018). Esta interferência pode por exemplo explicar as diferenças nas características dos extratos obtidos a partir do corno B5, quanto aos fenóis totais e quanto à atividade redutora férrica.

O corno B1 e B3 destacaram-se quanto à presença de compostos com atividade redutora férrica para qualquer dos solventes estudados e o corno B10 no caso do extrato obtido com acetona.

No caso do corno B6 a atividade redutora férrica dos extratos obtidos com água fervente foi claramente inferior à atividade redutora férrica dos extratos obtidos com acetona ou etanol.

A atividade anti-radicalar relativa ao DPPH de extratos de *Hypoxis hemerocallidea* obtidos a partir de diferentes cormos extraídos por maceração com a) acetona, b) etanol e c) água fervente (método tradicional) apresenta-se na Figura 3.5.

A atividade antiradicalar dos extratos obtidos com acetona variaram entre 3,2 e 7,8 g eq. de Trolox/L e de 149 a 440 mg eq. de Trolox/g de extrato seco.

Valores muito semelhantes foram obtidos para os extratos de etanol cuja atividade antiradicalar variou entre 2,9 e 8,6 g eq. de Trolox/L para os extratos em solução e entre 223 e 501 mg eq. de Trolox/g para os extratos secos.

Já no caso dos extratos aquosos registaram-se valores significativamente inferiores de atividade redutora nomeadamente 0,6 a 4,4 g eq. de Trolox/L para os extratos em solução e entre 98 e 267 mg eq. de Trolox/g para os extratos secos.

Estas diferenças podem dever-se aos diferentes mecanismos das reações envolvidas nestes testes pois enquanto a atividade redutora resulta da transferência de um electrão (single ion transfer) a atividade antiradicalar relativamente ao DPPH envolve geralmente a transferência de um electrão e um protão (single ion transfer e hydrogen atom transfer), pelo que os compostos que são ativos na atividade redutora podem não ser igualmente ativos na atividade anti-radicalar (Santos-Sánchez et al., 2016).

Ainda assim alguns extratos que se mostraram relevantes quanto ao teor de compostos fenólicos e quanto à atividade redutora apresentaram também valores elevados de atividade antiradicalar. É o caso dos extratos dos cormos B10, B2 e B3, obtidos respetivamente com acetona, etanol e água fervente.

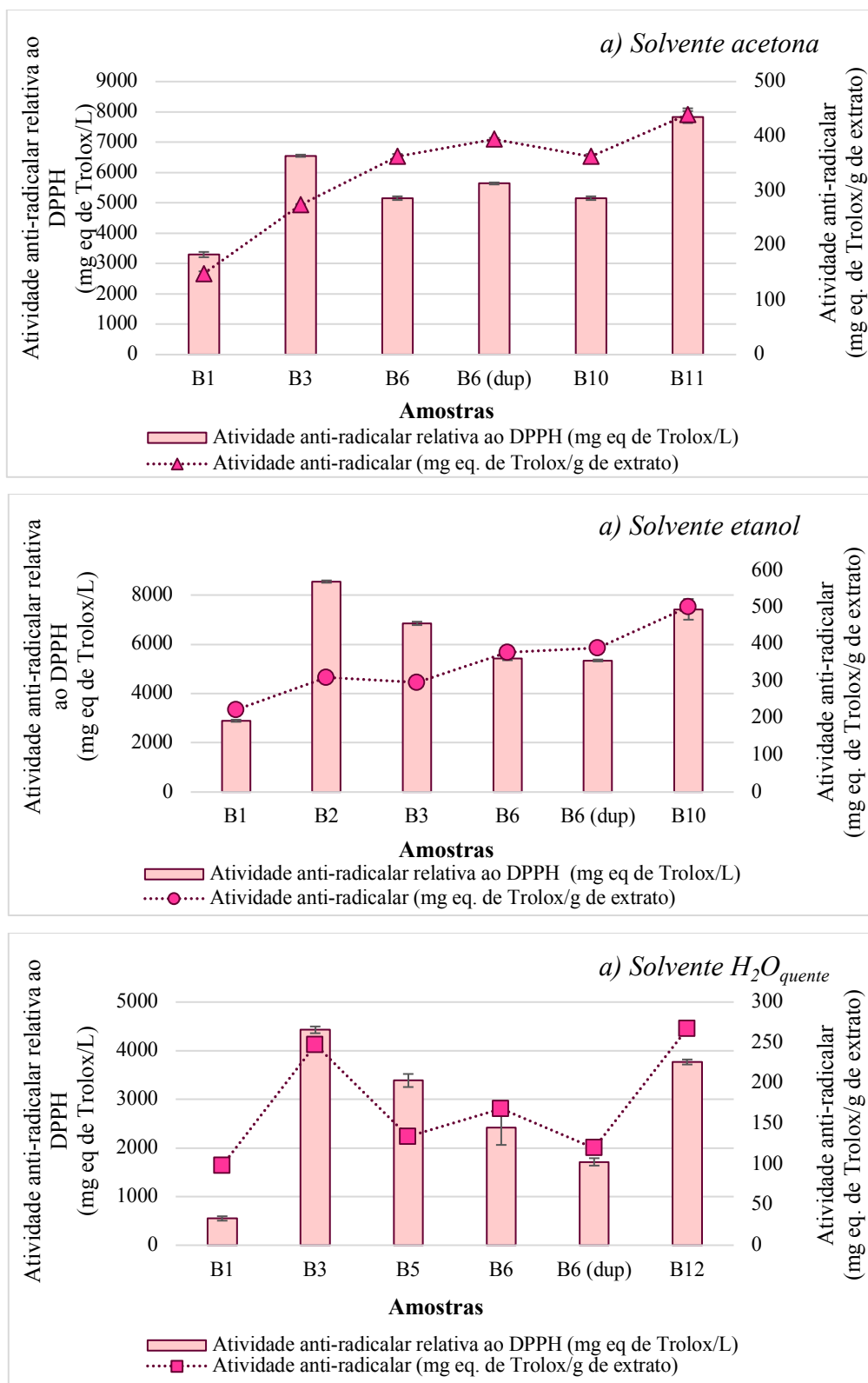


Figura 3.5: Atividade anti-radicalar relativa ao DPPH de extratos de *Hypoxis hemerocallidea* obtidos a partir de diferentes cormos extraídos por maceração com a) acetona, b) etanol e c) água fervente (método tradicional).

### 3.3.2. Fenólicos totais, atividade redutora férrica e atividade antiradicalar de extratos de *H. hemerocallidea* obtidos com misturas binárias de água e acetona

As características funcionais (fenóis totais, atividade redutora férrica e atividade antiradicalar) dos extratos de *Hypoxis hemerocallidea* obtidos com misturas binárias de água e acetona com diferentes percentagens de solvente orgânico são apresentadas na Figura 3.6.

A importância das condições fisiológicas dos cormos tanto no rendimento como no teor de fenóis, atividade redutora férrica e atividade anti-radicalar dos extratos foi evidenciada pelo diferente comportamento dos extratos obtidos a partir do mesmo cormo, com estas misturas binárias de acetona e água.

Observou-se uma variação regular do teor de fenóis entre 1,5 e 6,3 g de EAG/L e observou-se uma tendência para aumento do teor de fenólicos em solução com o aumento do teor de acetona no solvente de extração. Quando se considera a concentração de fenólicos no extrato seco está decresce de 240,4 para 329,9 mg eq. de Trolox/g de extrato seco, quando o teor de acetona passa de 100% para 25% mas sobe de novo ligeiramente para o extrato aquoso a quente. Se atendermos ao rendimento mássico deste extrato aquoso verificamos que este é bastante inferior aos extratos obtidos com misturas de acetona: água, portanto este efeito parece ser mais o resultado de uma menor co-extração de outros componentes do que de uma extração mais eficiente dos compostos fenólicos.

Já a atividade redutora férrica aumentou de 29,1 para 43,9 mmoles de  $\text{FeSO}_4$ /g de extrato, quando o teor de acetona no solvente de extração aumentou de 25% para 75% mas voltou a diminuir para o extrato produzido com 100% acetona (23,7 mmoles de  $\text{FeSO}_4$ /g de extrato). Este comportamento sugere que a extração de compostos com atividade redutora férrica é favorecida pela presença de alguma proporção de água e portanto, de um solvente mais polar. Esta hipótese é também suportada pela observação de um maior aumento da atividade redutora férrica do extrato aquoso seco relativamente ao extrato seco obtido com 25% acetona do que é observado para as duas outras propriedades medidas (fenóis totais e atividade antiradicalar), sugerindo que para além do efeito da redução do rendimento do extrato aquoso este é efetivamente mais rico em componentes com atividade redutora férrica.

A atividade antiradicalar apresentou um comportamento semelhante ao teor de compostos fenólicos totais aumentando regularmente com o aumento do teor de acetona no solvente de extração, destacando-se os extratos obtidos com 75% acetona e 100% acetona com os valores mais elevados desta atividade, 404 e 440 mg eq. de Trolox/g de extrato, respetivamente.

As elevadas concentrações de acetona tendem a favorecer a extração de outros metabolitos antioxidantes como os carotenóides, que existem tipicamente nos tubérculos e rizomas e que contribuem certamente para o tom amarelo alaranjado dos extratos obtidos com maior quantidade de solvente orgânico. Estes metabolitos têm um carácter mais apolar pelo que não são extraídos quando a quantidade de água no solvente de extração aumenta e a sua atividade antiradicalar é bem conhecida pelo que a sua presença no extrato poderá favorecer a atividade do extrato relativamente ao radical DPPH (Santos-Sánchez et al., 2016).

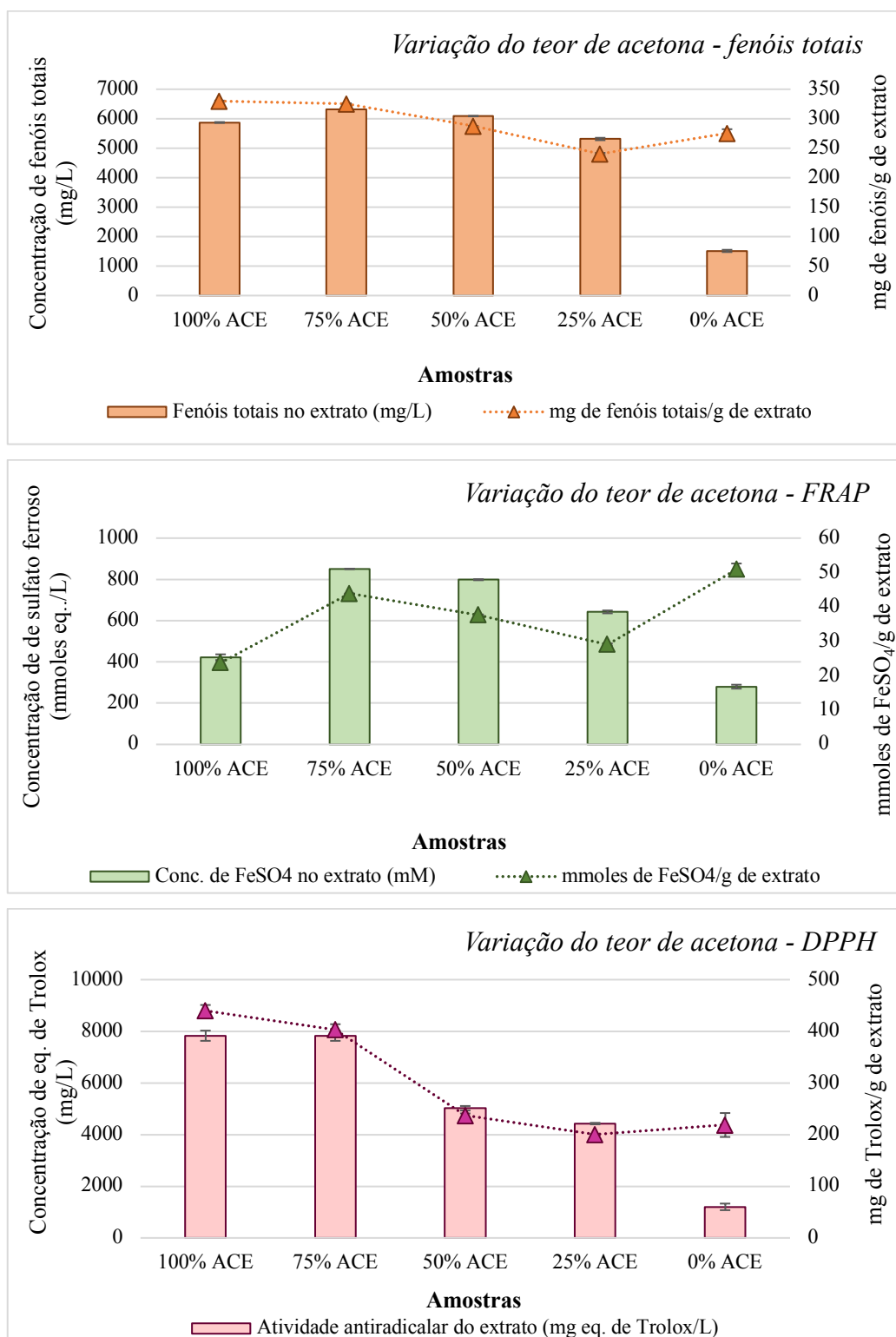


Figura 3.6: Fenóis totais, atividade redutora férrica e atividade antiradicalar de extratos de *Hypoxis hemerocallidea* obtidos com misturas binárias de água e acetona com diferentes percentagens de solvente orgânico.

### 3.3.3. Fenóis totais, atividade redutora férrica e atividade antiradicalar de extratos de *Hypoxis hemerocallidea* obtidos com misturas binárias de água e etanol

A caracterização dos extratos de *Hypoxis hemerocallidea* obtidos com misturas de água e etanol com diferentes percentagens de solvente orgânico, quanto aos parâmetros de fenóis totais, atividade redutora férrica e atividade antiradicalar é apresentada na Figura 3.7.

O teor de fenólicos destes extratos variou entre 6,4 e 11,8 g EAG/L para os extratos líquidos e entre 275 e 427 mg/g de extrato, para os extratos secos. Este parâmetro aumentou com o aumento da percentagem de etanol no solvente de extração, uma tendência análoga à observada nos extratos obtidos com acetona a partir do corno B11.

A atividade redutora férrica dos extratos de *Hypoxis hemerocallidea* obtidos com misturas de água e etanol oscilou entre 429,9 a 813,1 mmoles de  $\text{FeSO}_4/\text{L}$  e entre 18,53 e 29,63 mmoles de  $\text{FeSO}_4/\text{g}$  de extrato. Este parâmetro teve um comportamento mais regular do que o observado nos extratos de acetona apresentando basicamente dois níveis distintos: valores mais elevados (813,1 e 764,5 mmoles de  $\text{FeSO}_4/\text{L}$ ) para os extratos obtidos com 100% e 75% de etanol aquoso e valores mais baixos (468,8 e 429,9 mmoles de  $\text{FeSO}_4/\text{L}$ ) para os extratos obtidos com 50% e 25% de etanol aquoso.

No caso do corno B2 não havia massa suficiente para testar a extração com água fervente pelo que não foi possível estabelecer a comparação que foi efetuada no caso do corno B11.

A atividade antiradicalar dos extratos de *Hypoxis hemerocallidea* obtidos com misturas de água e etanol oscilou entre 1737 e 8547 mg eq. de Trolox/L para os extratos líquidos e entre 75 e 310 mg eq. de Trolox/g de extrato. Esta atividade apresentou um comportamento distinto do observado para os outros dois parâmetros de capacidade antioxidante (fenóis totais e atividade redutora férrica) o que evidencia as diferenças entre os compostos com atividade anti-radicalar e atividade redutora. Tal como observado no caso dos extratos obtidos com acetona a partir do corno B11, também a atividade radicalar dos extratos do corno B2 obtidos com etanol diminui rapidamente com o decréscimo da percentagem de etanol.

Este comportamento sugere que os extratos contêm compostos com caráter apolar ou mediantemente polar com atividade anti-radicalar que são progressivamente menos extraídos quando o teor de etanol no solvente de extração diminui.



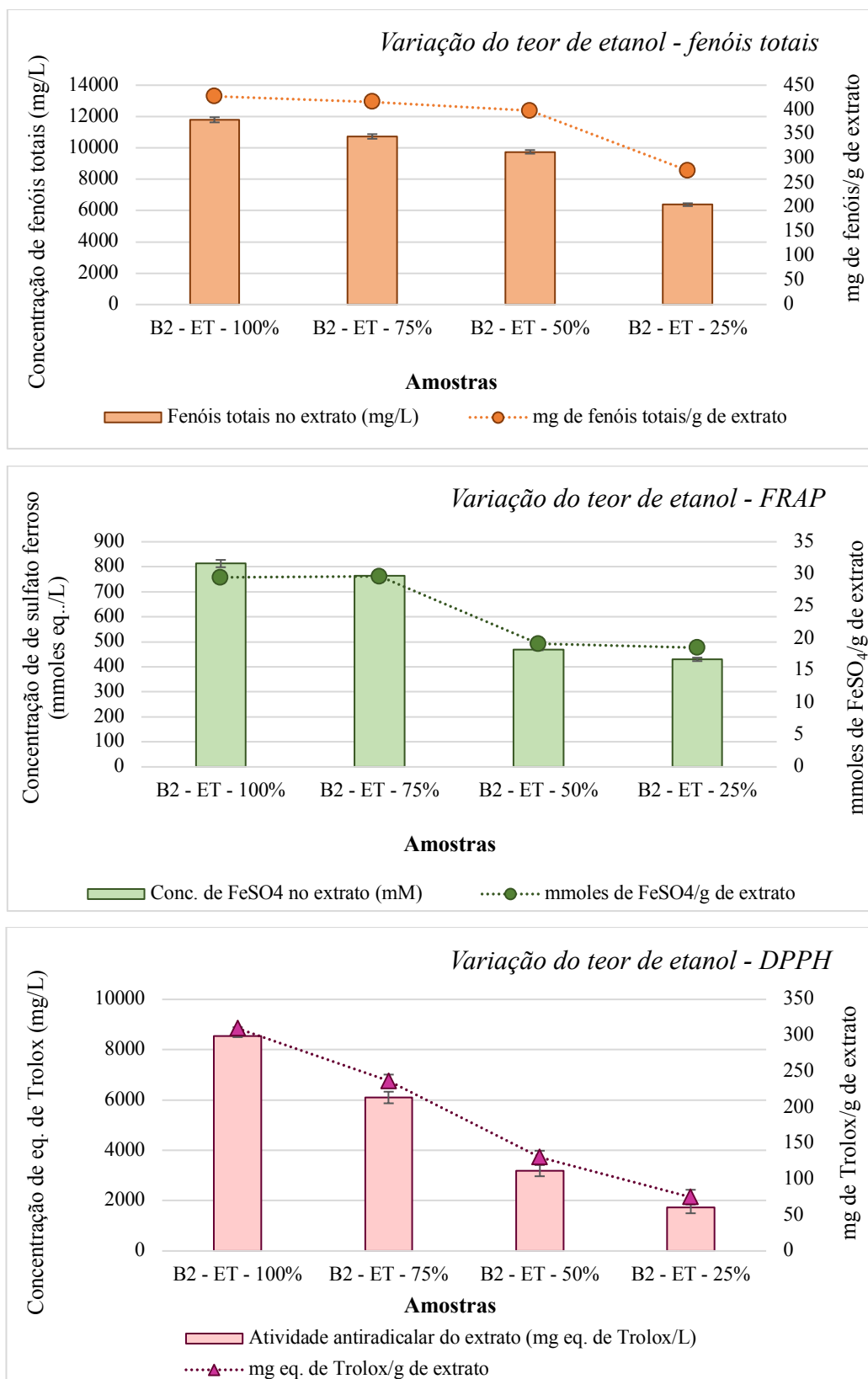


Figura 3.7: Fenóis totais, atividade redutora férrica e atividade antiradicalar de extratos de *Hypoxis hemerocallidea* obtidos com misturas de água e etanol com diferentes percentagens de solvente orgânico.

### 3.3.4. Fenóis totais, atividade redutora férrica e atividade antiradicalar de extratos de *Hypoxis hemerocallidea* obtidos com diferentes solventes a partir de cormos com e sem pele.

A presença ou ausência da pele do corno é um fator que poderia afetar a extração de compostos bioativos, tanto por conter quantidades menores destes compostos como por limitar a sua dissolução no solvente de extração.

Por outro lado, a necessidade de remover a pele é uma informação relevante se se pretender industrializar a extração de compostos bioativos a partir dos cormos de *Hypoxis hemerocallidea*.

Assim considerou-se interessante avaliar as propriedades funcionais de extratos obtidos a partir de cormos de *Hypoxis hemerocallidea* com e sem pele utilizando os três solventes estudados anteriormente para os vários cormos (acetona, etanol e água fervente). Os resultados obtidos relativamente ao teor de fenóis totais, atividade redutora férrica e atividade antiradicalar destes extratos são apresentados na Figura 3.8.

O teor de fenóis totais dos extratos obtidos a partir do corno B6, variaram entre 4,9 e 6,7 g EAG/L para os extratos líquidos e entre 344 e 453 mg EAG/g de extrato seco.

Não se observaram diferenças relevantes no teor de fenóis dos extratos obtidos com os diferentes solventes nem a partir dos cormos com ou sem pele exceto no caso do solvente em água fervente, para o qual a presença da pele do corno pareceu favorecer o teor de fenóis totais do respetivo extrato. Este resultado pode significar que o solvente água poderá extrair componentes da casca, como pigmentos fenólicos do tipo tanino que contribuem para o teor de compostos fenólicos (de Hoyos-Martínez et al., 2019).

Por outro lado, os valores elevados de fenóis nestes extratos aquosos (com e sem pele) sugerem a presença de interferentes positivos da reação de Folin-Ciocalteu, como os açúcares redutores (O'Sullivan & Mathison, 2005).

A atividade redutora férrica dos extratos obtidos a partir do corno B6 variaram entre 237 e 662 mmol de  $\text{FeSO}_4/\text{L}$  para os extratos líquidos e entre 16,5 e 48 mmol de  $\text{FeSO}_4/\text{g}$  de extrato para os extratos secos.

Esta atividade nos extratos obtidos com etanol ou acetona variou entre 518 e 662 mmol de  $\text{FeSO}_4/\text{L}$  e seguiu um padrão semelhante ao observado para o teor de fenóis totais não se observando diferenças relevantes entre extratos obtidos com estes solventes a partir do corno com ou sem pele.

No entanto, os extratos obtidos com água fervente apresentaram valores de atividade redutora férrica, entre 237 e 433 mmol de  $\text{FeSO}_4/\text{L}$  uma gama inferior à observada para os extratos obtidos com os solventes orgânicos. Este diferente comportamento reforça a hipótese de que os valores elevados de fenóis nestes extratos aquosos podem estar afetados por uma interferência positiva de açúcares que não se faz sentir com a mesma intensidade no caso do ensaio da atividade redutora férrica.

A atividade anti-radicalar relativa ao DPPH dos extratos obtidos a partir do corno B6 variaram entre 1,7 e 5,6 g eq de Trolox/L para os extratos líquidos e entre 120 e 394 mg eq de Trolox/g de extrato para os extratos secos.

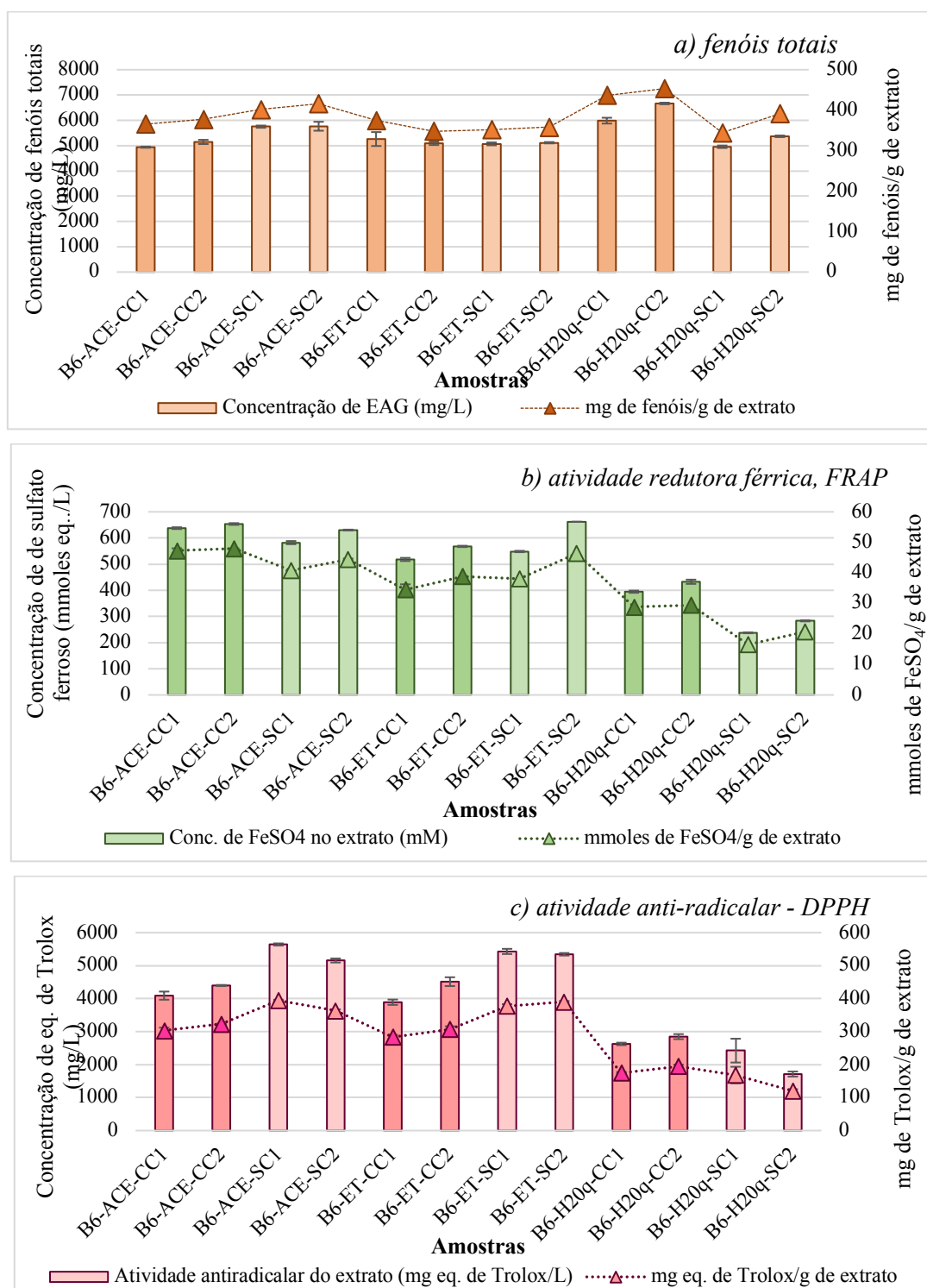


Figura 3.8: Fenóis totais, atividade redutora férrica e atividade antiradicalar de extratos de *Hypoxis hemerocallidea* obtidos com diferentes solventes a partir de cornos com e sem pele.

A atividade anti-radicalar destes extratos seguiu um padrão análogo à atividade redutora férrica no que diz respeito às diferenças entre solventes pois os extratos obtidos com acetona ou etanol apresentaram valores de atividade anti-radicalar superiores aos registados para os extratos obtidos com água fervente.

Um aspeto distintivo desta propriedade, é que apresentou valores ligeiramente mais elevados para os extratos de acetona ou etanol a partir do corno sem pele por comparação com os extratos obtidos com os mesmos solventes a partir do corno com pele.

Estes resultados podem refletir uma maior presença de compostos solúveis em acetona ou etanol na polpa do que na pele ou uma maior atividade antiradicalar dos compostos extraídos da polpa relativamente aos extraídos a partir da casca. A confirmação desta hipótese requer uma análise mais detalhada destes extratos a nível molecular.

A caracterização dos componentes e atividades funcionais de extratos aquosos obtidos a partir de cormos de *Hypoxis hemerocallidea* foi efetuada por Laporta e colaboradores (2007), num trabalho que continua a ser a principal referência de avaliação destes extratos. Estes autores compararam extratos aquosos de *Hypoxis hemerocallidea*, chá verde (*Camelia sinensis*) e de folha de oliveira (*Olea europaea* L.) através dos ensaios ORAC (oxygen radical absorbance capacity) e TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) tendo concluído que os extratos de *Hypoxis hemerocallidea*, apresentavam a maior atividade em qualquer destes ensaios.

Mwinga e colaboradores (2019) observaram conteúdos fenólicos e flavonoides totais de extratos de cormos de *Hypoxis hemerocallidea* de 41,057 mg de EAG/L e de 10, 140 mg CE/g respectivamente.

Não se encontraram dados relativos ao teor de fenólicos totais em extratos secos de cormos de *Hypoxis* na literatura, mas os valores que se encontraram neste trabalho (23 a 66 % g/g extrato seco) são superiores aos encontrados por Liu e co-autores (2020) para folhas de chá (9,5 a 18,8 % g/g de folha seca).

Também não foi possível encontrar exemplos da avaliação da atividade antiradicalar de extratos de *Hypoxis hemerocallidea*, relativamente ao radical DPPH mas diferentes autores confirmaram que extratos aquosos e etanólicos de *Hypoxis hemerocalídea* apresentaram boas propriedades antioxidantes em relação ao radical hidroxilo (Nair et al., 2007; Steenkamp & Gouws, 2006).

### **3.4. Perfil cromatográfico por HPLC-DAD**

O perfil cromatográfico dos extratos obtidos com acetona, etanol e água fervente a partir do corno B3 apresentam-se nas Figuras 3.9, 3.10 e 3.11.

Os principais componentes encontrados apresentam máximos de absorvância em torno dos 260, 290 e 305 nm tal como descrito para o hipoxósido, o rooperol, compostos derivados e isómeros pelo que concluímos que os extratos são ricos em compostos das famílias dos linhanos, norlinhanos e neolinhanos (Bassey et al., 2015; Laporta et al., 2007).

Apesar de não ter sido utilizada uma técnica confirmativa (como o LC-MS-MS), a semelhança entre os perfis cromatográficos por HPLC-DAD, a identidade da matriz e as concentrações relativas dos compostos permitiram-nos atribuir aos principais picos cromatográficos uma identidade provável como correspondendo ao hipoxósido, dehidroxihipoxósido, bis-dehidroxihipoxósido e ao rooperol por comparação com informação análoga obtida para extratos de cormos de *Hypoxis* (Laporta et al., 2007).

Os espectros de UV-VIS dos restantes componentes detetados permitiram identificar a presença de diversos componentes análogos que poderão ser isómeros ou outros norlinhanos.

Os extratos de acetona apresentam um pico intenso no início do cromatograma que pelo espectro e tempo de retenção poderá ser um ácido hidroxibenzóico. Este pico também foi encontrado nos extratos de etanol e água mas com menor intensidade.

Nos espectros de água foram também encontrados alguns componentes com espectros de UV-VIS típicos de flavonóis nomeadamente com máximos de absorvância a 373, 366 e 359 nm (Neves et al., 2018).

Bassey e colaboradores (2015) identificaram como principais componentes do extrato de *H. colchicifolia* and *H. galpinii* os seguintes compostos:  $\beta$ -Sitosterol, glicosídeo do geraniol, glicosídeo do orcinol, hipoxósido, dehidroxihipoxósido, bis-dehidroxihipoxósido e galpinosídeo.

Laporta e co-autores (2007) caracterizaram a capacidade antioxidante e principais metabolitos secundários encontrados em extratos de *Hypoxis hemerocallidea*. Os principais componentes ativos detetados por estes autores utilizando HPLC com deteção seletiva a 260 nm foram o hipoxósido, dehidroxihipoxósido, bis-dehidroxihipoxósido, rooperol, dehidroxirooperol e bis-dehidroxirooperol.

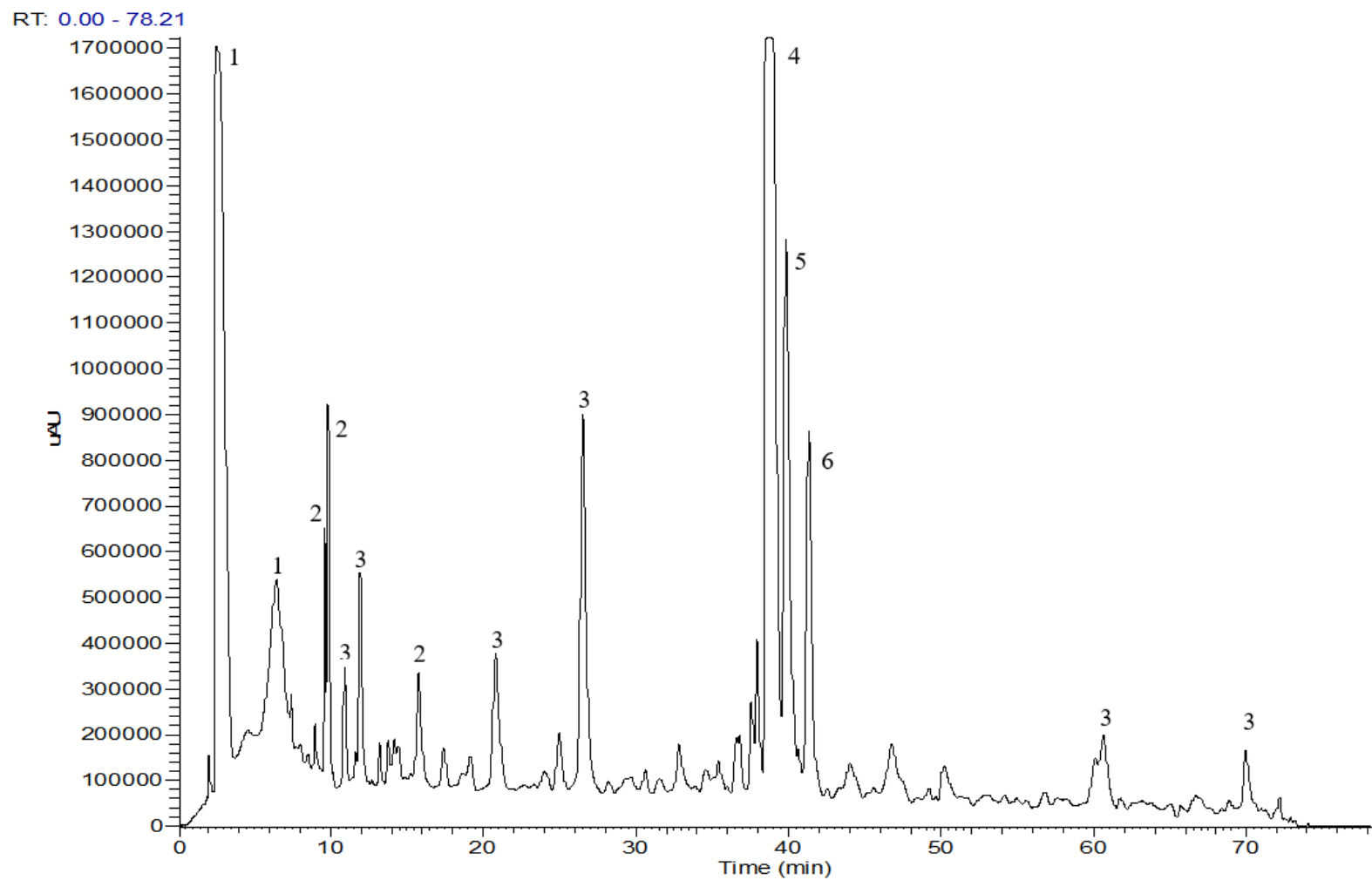


Figura 3.9: Perfil cromatográfico do extrato de *Hypoxis hemerocallidea* obtido com acetona a partir do corno B3 (1. ácidos hidroxibenzóicos, 2. Rooperol ou isômeros, 3. isômeros do hipoxósido, 4. *Hipoxósido*, 5. *dehidroxihipoxósido*, 6. *bis-dehidroxihipoxósido*).

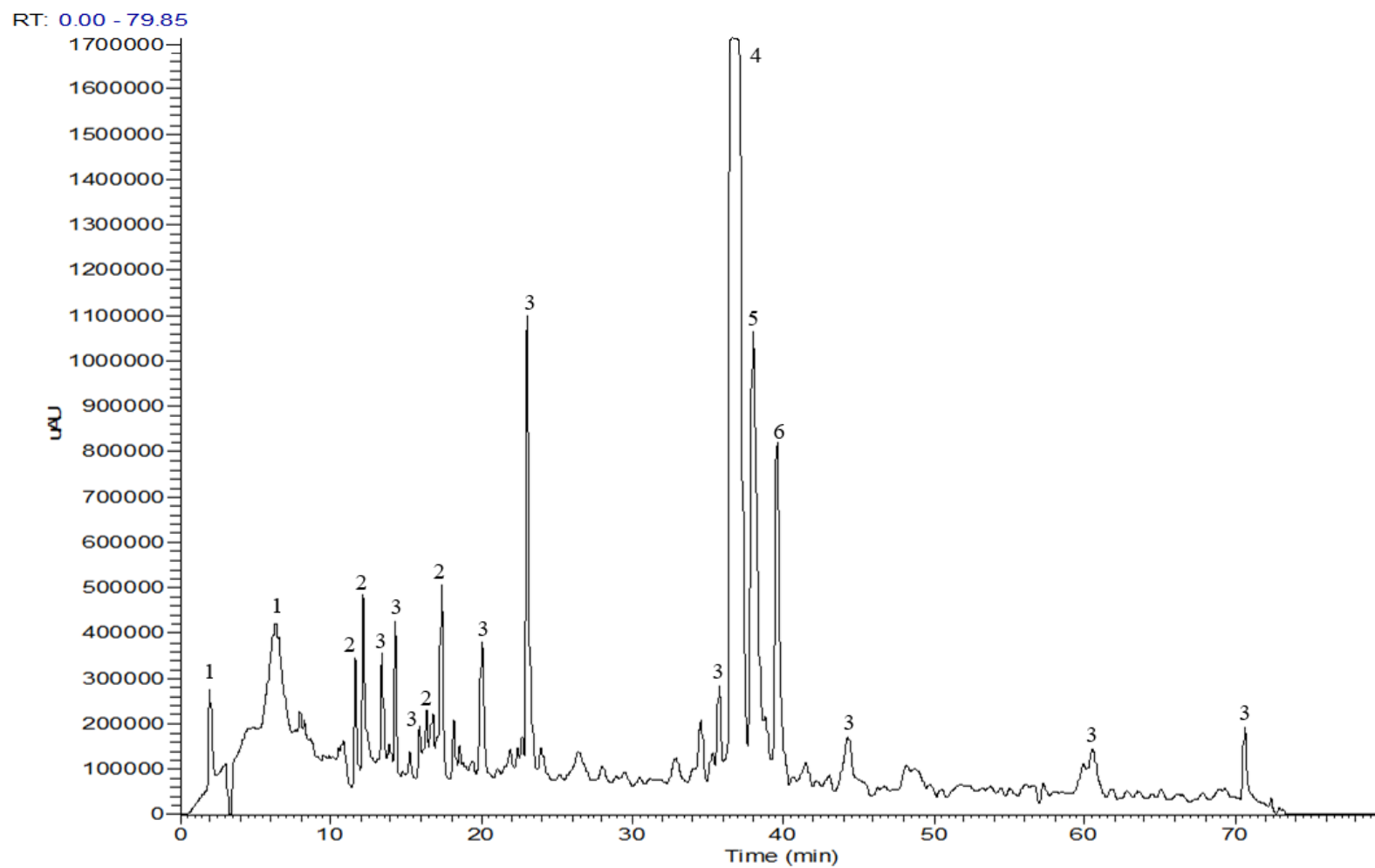


Figura 3.10: Perfil cromatográfico do extrato de *Hypoxis hemerocallidea* obtido com etanol a partir do corno B3 (1. ácidos hidroxibenzóicos, 2. Rooperol ou isómeros, 3. isómeros do hipoxósido, 4. Hipoxósido, 5. dehidroxihipoxósido, 6. bis-dehidroxihipoxósido).

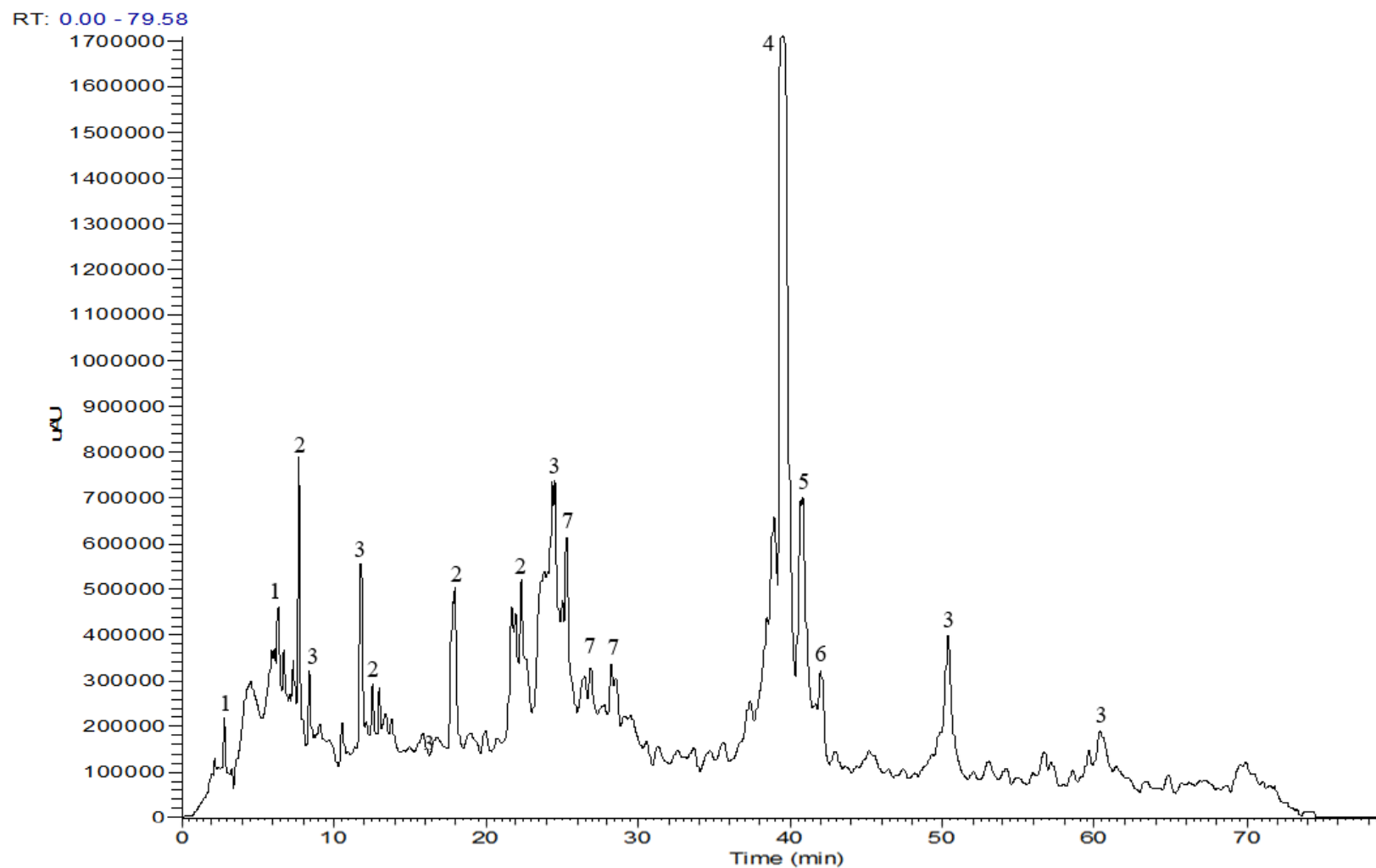


Figura 3.11: Perfil cromatográfico do extrato de *Hypoxis hemerocallidea* obtido com água fervente a partir do corno B3(1. ácidos hidroxibenzóicos, 2. Rooperol ou isómeros, 3. isómeros do hipoxósido, 4. *Hipoxósido*, 5. *dehidroxihipoxósido*, 6. *bis-dehidroxihipoxósido*, 7. flavonóis).



### 3.5. Ensaio de digestão intestinal

#### 3.5.1. Caracterização dos extratos de *Hypoxis hemerocallidea* e dos correspondentes digeridos após digestão intestinal

Os extratos obtidos com acetona, etanol e água fervente a partir do corno B3 foram normalizados a uma concentração de 1 mg/mL e submetidos a digestão intestinal para avaliar as alterações das suas propriedades funcionais e dos seus compostos ativos durante o processo digestivo.

Os teores de compostos fenólicos totais (mg eq. EAG/L) de extratos de *Hypoxis hemerocallidea*, obtidos com acetona, etanol e água fervente e dos correspondentes digeridos após digestão gastrointestinal simulada apresentam-se na Figura 3.12.

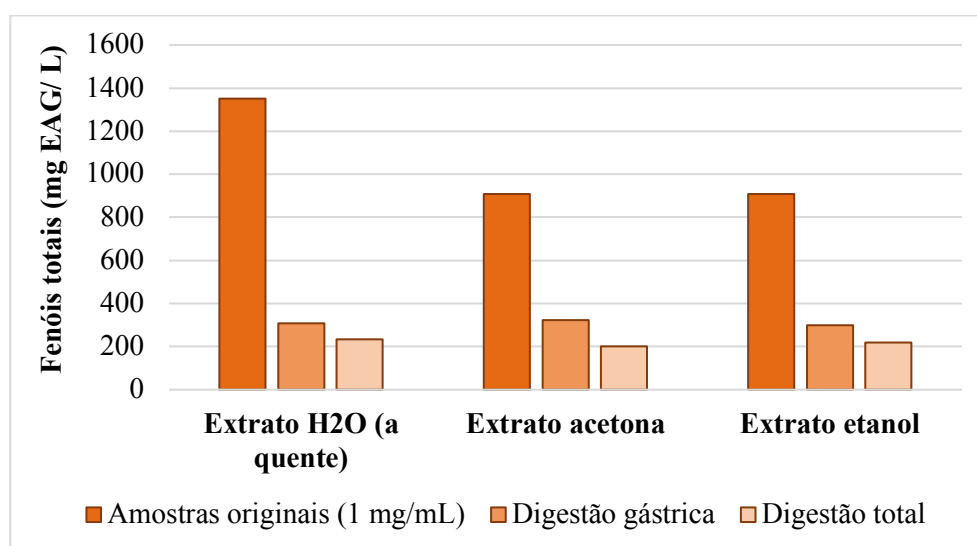


Figura 3.12: Teor de compostos fenólicos totais (mg eq. EAG/L) de extratos de *Hypoxis hemerocallidea*, obtidos com acetona, etanol e água fervente e dos correspondentes digeridos após digestão intestinal.

Os resultados obtidos indicam que os compostos fenólicos dos extratos sofreram alterações durante a digestão intestinal, tendo-se observado uma redução acentuada da sua concentração no extrato, avaliada pela reação de Folin-Ciocalteu, sobretudo na fase gástrica mas que ainda se acentuou ligeiramente na fase intestinal conduzindo a valores finais de fenóis totais nos digeridos que foram 17% a 24% dos valores iniciais nos extratos.

Estes resultados sugerem a ausência de espécies polifenólicas que possam por hidrólise compensar a decomposição de fenóis simples durante o processo digestivo e assim assegurar que a concentração de fenóis totais e a atividade antioxidante associada se mantêm ou até aumenta durante este processo.

Este efeito é mais frequentemente encontrado na digestão gastrointestinal simulada de alimentos completos nos quais o aumento de atividade antioxidante pode ocorrer por solubilização de espécies fenólicas a partir da matriz (Chen et al., 2019; Pellegrini et al., 2017).

A atividade anti-radicalar em relação ao DPPH (mg ET/g extrato) dos mesmos extratos de *Hypoxis hemerocallidea*, obtidos com acetona, etanol e água fervente e dos correspondentes digeridos após digestão intestinal apresenta-se na Figura 3.13.

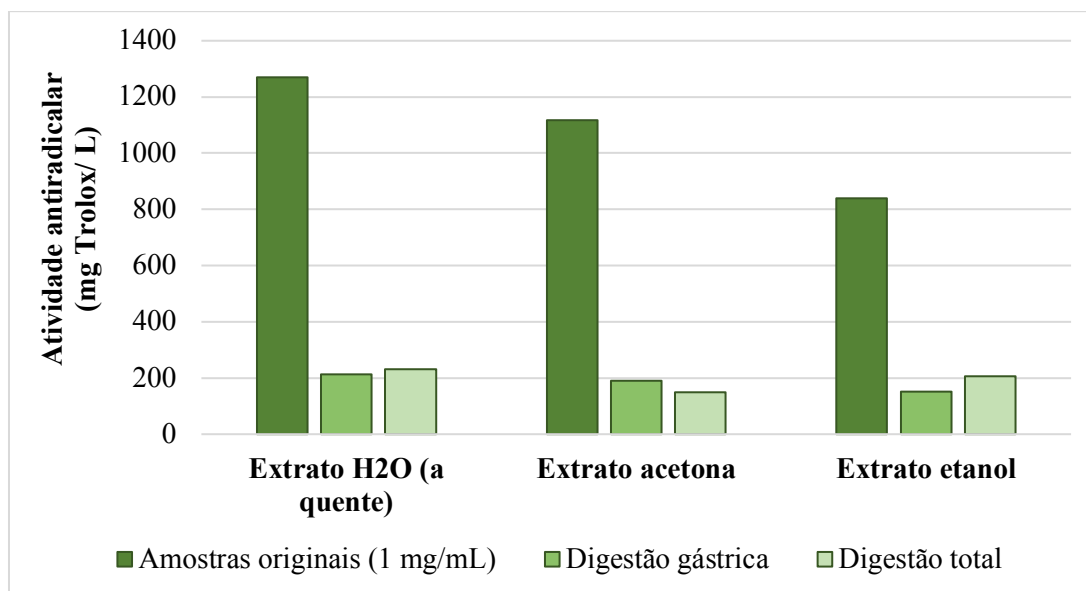


Figura 3.13: Atividade anti-radicalar em relação ao DPPH (mg ET/g extrato) de extratos de *Hypoxis hemerocallidea*, obtidos com acetona, etanol e água fervente e dos correspondentes digeridos após digestão gastrointestinal simulada.

A atividade antiradicalar dos extratos também sofreu uma redução acentuada durante o processo de digestão intestinal, sendo o maior decréscimo registado na fase gástrica. No entanto no caso dos extratos mais polares (água e etanol) observou-se uma ligeira subida da atividade antiradicalar durante a fase intestinal, que pode corresponder à hidrólise de algumas espécies fenólicas com libertação de mais compostos ativos. Ainda assim os valores finais de atividade anti-radicalar dos digeridos foram 13 a 26 % do valor observado nos extratos originais.

Um efeito semelhante de diminuição da concentração de fenóis totais e da atividade antioxidante como resultado da digestão intestinal, foi observado por Ortega-Vidal e co-autores (2019) para chás de *Jasonia glutinosa* D.C. (Asteraceae), e por Lima e colaboradores (2019) para infusões de *Artemisia gorgonum* Webb e *Hyptis pectinata* (L.) Poit., plantas medicinais da zona mediterrânica e de Cabo Verde, ambas ricas em ácidos cafeoilquínicos.

Xiao e colaboradores (2014) também observaram um decréscimo acentuado da atividade antioxidante de extratos de *Radix Isatidis*, uma raiz usada em medicina tradicional chinesa, após a sua digestão gastrointestinal simulada.

### 3.5.2. Perfil cromatográfico de HPLC-DAD dos extratos de *Hypoxis hemerocallidea* e dos correspondentes digeridos após digestão intestinal

Os perfis cromatográficos de HPLC-DAD dos extratos de *Hypoxis hemerocallidea* obtidos com etanol e dos correspondentes digeridos após digestão intestinal são apresentados na Figura 3.14.

É detetável um decréscimo das áreas cromatográficas de todos os picos do perfil em particular os correspondentes aos principais componentes o hipoxósido e o dehidroxihipoxósido.

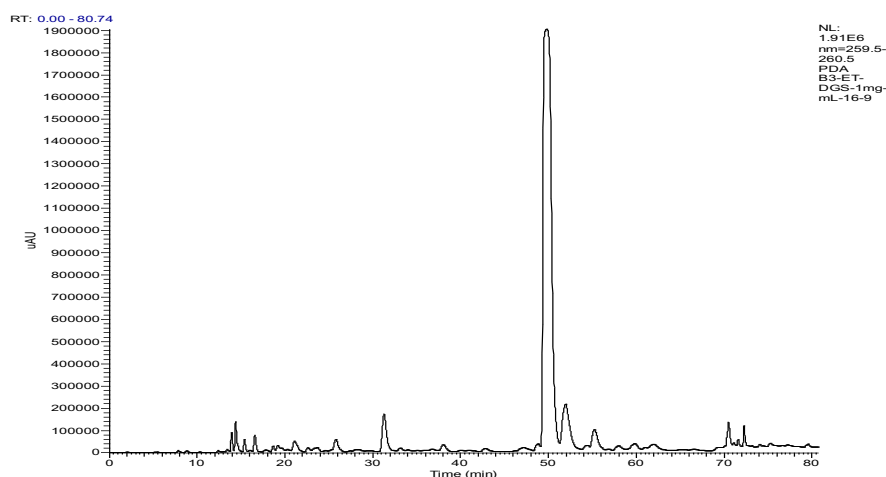
Não se observou o aparecimento de novos picos que possam corresponder aos produtos da decomposição do hipoxósido. Esta observação pode significar que os produtos da hidrólise dos glucosídeos dos norlinhanos apresentam menor solubilidade em água e poderão ter sido eliminados do digerido durante o passo de centrifugação.

Um comportamento idêntico foi observado para o extrato de acetona e os correspondentes digeridos.

Para qualquer destes extratos o decréscimo das áreas cromatográficas não foi tão acentuado como o decréscimo do teor de fenólicos totais e da atividade antiradicalar relativa ao DPPH, avaliadas pelos testes colorimétricos.

Esta observação sugere que poderão existir componentes dos extratos que contribuem para as suas propriedades funcionais e que não são detetados na análise cromatográfica.

Pellegrini e co-autores (2017) observaram também diferenças de comportamento durante a digestão gastrointestinal simulada de sementes de quinoa. Estes autores detetaram reduções importantes da concentração dos principais componentes fenólicos por LC-MS e no entanto observaram aumento da atividade antioxidante dos extratos em diversos ensaios colorimétricos.



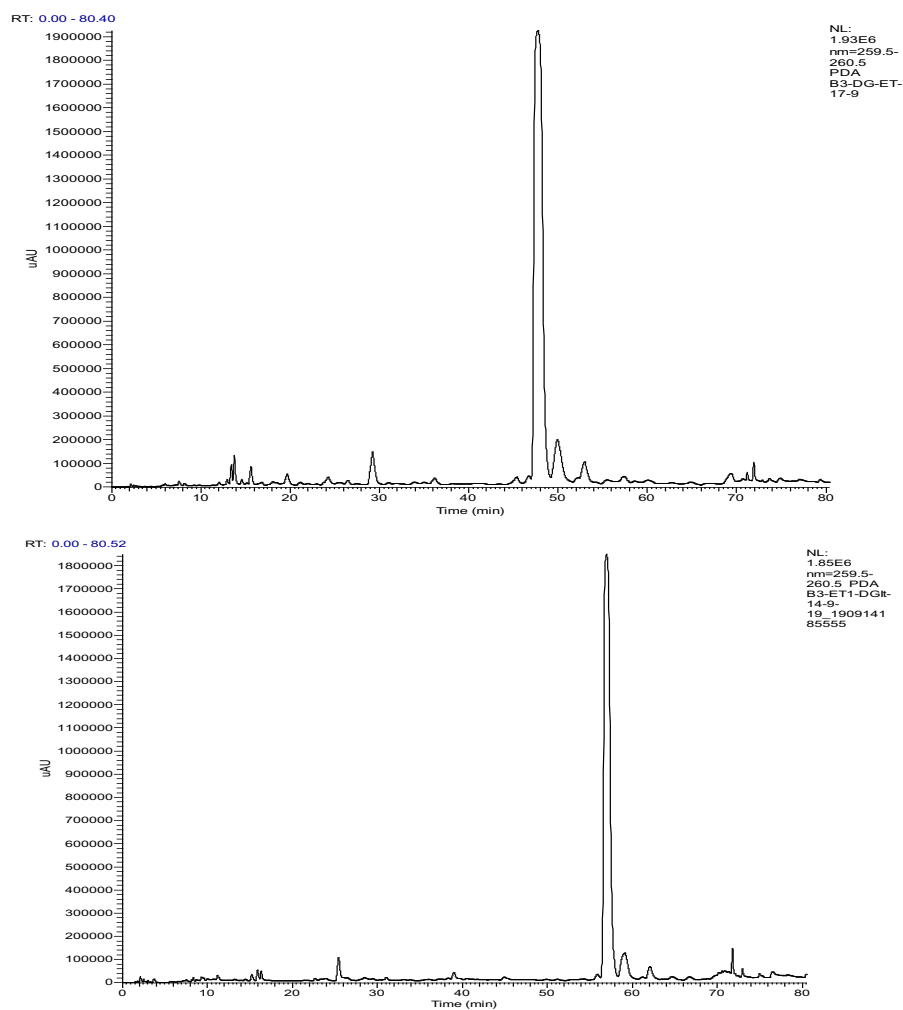
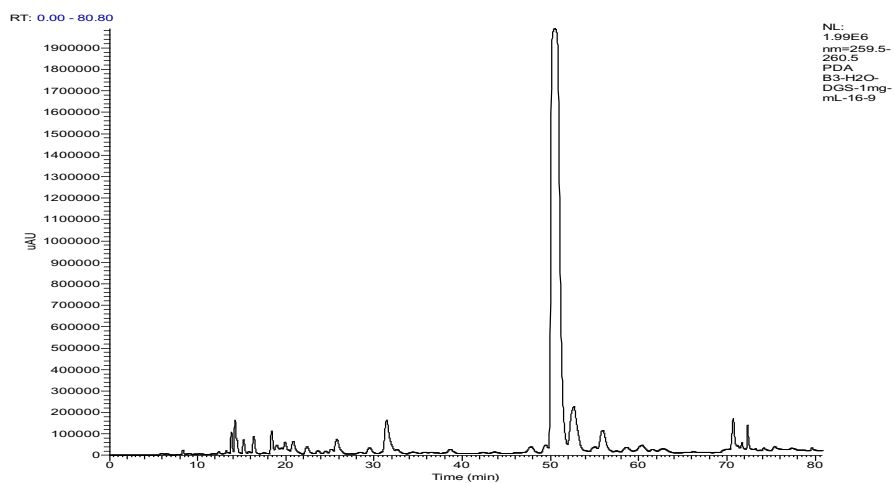


Figura 3.14: Perfil cromatográfico por HPLC-DAD dos extratos de de *Hypoxis hemerocallidea* obtidos com etanol e dos correspondentes digeridos após digestão intestinal

Os perfis cromatográficos de HPLC-DAD dos extratos de de *Hypoxis hemerocallidea* obtidos com etanol e dos correspondentes digeridos após digestão intestinal são apresentados na Figura 3.15.



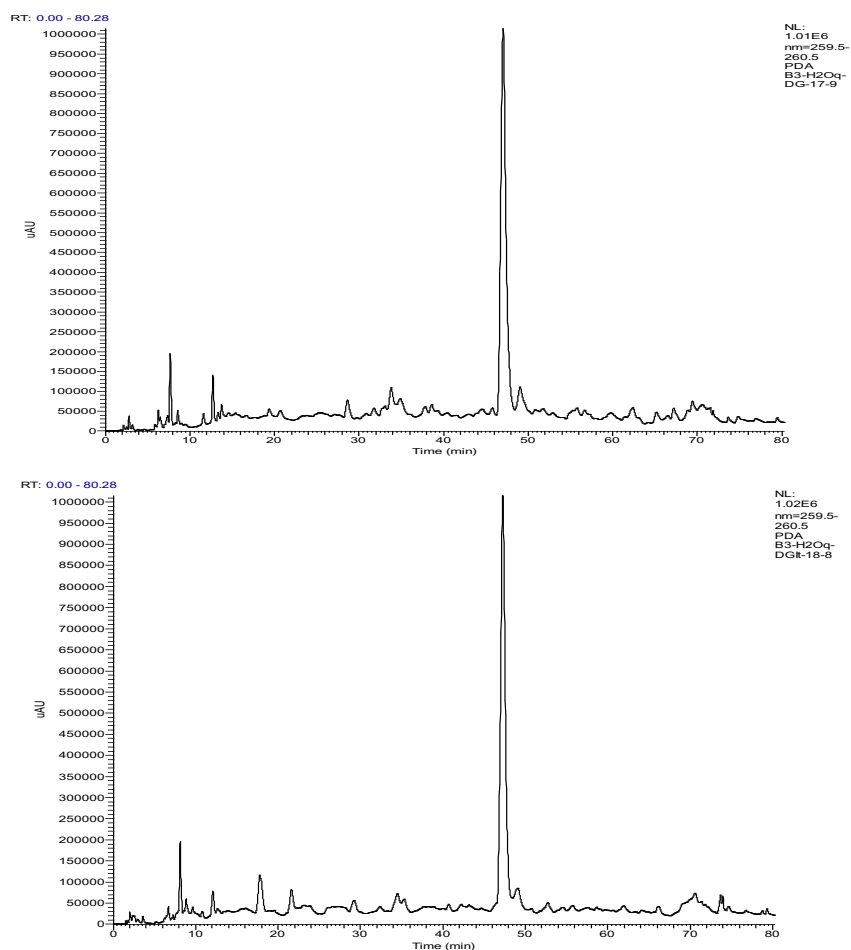


Figura 3.15: Perfil cromatográfico por HPLC-DAD dos extratos de *Hypoxis hemerocallidea* obtidos com água fervente e dos correspondentes digeridos após digestão intestinal.

Os extratos aquosos sofreram alterações idênticas às observadas para os extratos de etanol e de acetona observando-se um decréscimo acentuado das áreas cromatográficas correspondentes ao hipoxósido e o dehidroxihipoxósido. No caso dos extratos de água esse decréscimo ocorreu de forma mais acentuada e tanto na fase gátrica como na fase intestinal. Os valores obtidos para as áreas cromatográficas dos extratos utilizados na digestão gastrointestinal simulado e dos correspondentes digeridos, encontram-se descritas na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Variação da área cromatográfica do hipoxósido e do dehidroxihipoxósido entre os extratos de *Hypoxis hemerocallidea* e os respectivos digeridos expressa em termos de áreas totais e de % de recuperação.

Amostra	Área cromatográfica		% de Recuperação	
	hipoxósido	dehidroxihipoxósido	hipoxósido	dehidroxihipoxósido
<b>Acetona</b>				
1 mg/L	134791379	11366859		
DG	135949462	10745061	101	93
DT	99753152	6220824	74	54

**Etanol**

1 mg/L	122503022	11536084		
DG	122177792	10181745	100	88
DT	91487829	6351480	75	55
<b>H2Oq</b>				
1 mg/L	130674849	11240771		
DG	41731793	3412103	34	30
DT	39719110	2730334	32	24

Como se pode observar na Tabela 3.4 a área cromatográfica do hipoxósido e do dehidroxihipoxósido nos extratos de acetona e etanol foi pouco afetada pela digestão gástrica sofrendo uma redução mais acentuada durante a digestão intestinal. Globalmente verificaram-se recuperações de cerca de 75 % do hipoxósido e de cerca de 55 % do dehidroxihipoxósido.

Já no caso do extrato aquoso, apesar de as áreas cromatográficas destes dois compostos serem comparáveis às dos extratos de acetona e etanol (porque foram normalizados antes da digestão gastrointestinal simulada), apenas 34 % do hipoxósido e 30 % do dehidroxihipoxósido foram recuperados após a fase gástrica. Considerando a digestão total, as concentrações finais de hipoxósido e dehidroxihipoxósido, no digerido do extrato aquoso foram 32 % e 24 % dos respetivos teores no extrato aquoso original.

Este comportamento tão distinto do extrato aquoso não foi observado nos testes colorimétricos dos digeridos e reforça a ideia de que estas técnicas dão informações complementares sobre o efeito do processo digestivo sobre os componentes e propriedades funcionais dos extratos.

#### 4. Conclusões

Os cormos de *Hypoxis hemerocallidea* apresentaram um teor de humidade 36 % e teores de cinzas, gordura, proteína e hidratos de carbono respetivamente 4,6, 0,6, 4,4 e 54,2 % em base húmida.

Os extratos de *Hypoxis hemerocallidea* obtidos por maceração em acetona ou misturas de acetona e água apresentaram rendimentos mássicos de 13,5 a 23,9 g/L e caracterizaram-se por fenóis totais entre 1,5 e 6,4 g EAG/L, atividade redutora férrica entre 582 a 851 mmols de  $\text{FeSO}_4/\text{L}$  e atividade anti-radicalar relativamente ao DPPH entre 1,2 a 7,8 g de Trolox/L.

Os extratos de *Hypoxis hemerocallidea* obtidos por maceração em etanol ou misturas de etanol e água apresentaram rendimentos mássicos de 13,0 a 27,6 g/L e caracterizaram-se por fenóis totais entre 4,9 e 11,7 g EAG/L, atividade redutora férrica entre 518 a 813 mmols de  $\text{FeSO}_4/\text{L}$  e atividade anti-radicalar relativamente ao DPPH entre 1,7 a 8,6 g de Trolox/L.

Os extratos de *Hypoxis hemerocallidea* obtidos com água fervente (método tradicional) apresentaram rendimentos mássicos de 5,5 a 25,3 g/L e caracterizaram-se por fenóis totais entre 3,7 e 9,3 g EAG/L, atividade redutora férrica entre 216 a 461 mmols de  $\text{FeSO}_4/\text{L}$  e atividade anti-radicalar relativamente ao DPPH entre 0,6 a 4,4 g de Trolox/L.

Os extratos obtidos por maceração em água fria apresentaram valores de rendimento muito inferiores aos restantes.

A natureza da matriz foi o fator que introduziu maior variabilidade quer no rendimento de extração quer nas características dos extratos obtidos. As variações nos teores de humidade, açúcares simples, ácidos orgânicos e aminoácidos livres bem como dos metabolitos secundários de natureza fenólica que acontecem em função da sazonalidade, maturidade da planta e condições ambientais são parâmetros suscetíveis de originar esta variabilidade.

A presença ou ausência de pele no corno não influenciou de forma relevante o rendimento de extração ou as características dos extratos obtidos, exceto um ligeiro aumento de fenólicos totais nos extratos obtidos com pele pelo método tradicional com água quente.

Os extratos apresentaram diversos componentes com espectros de UV-VIS característicos de glucosídeos de norlinhanos e por comparação com dados da literatura foi possível identificar os picos cromatográficos correspondentes ao hipoxósido, dehidroxihipoxósido e bis-dehidroxihipoxósido em todos os extratos. Nos extratos de acetona encontraram-se picos cromatográficos com espectros semelhantes a ácidos hidroxibenzóicos e nos extratos de água fervente encontraram-se picos cromatográficos com espectros semelhantes a flavonóis.

A digestão simulada dos extratos de acetona e etanol e água fervente obtidos a partir do corno B3 provocou um decréscimo 76 % a 83 % do teor de fenóis totais e de 75 % a 87 % da atividade antiradicalar relativa ao DPPH. No entanto, a redução das áreas cromatográficas do pico correspondente ao hipoxósido foi de 26 %, 25 % e 68 % respetivamente para os extratos de acetona, etanol e água fervente.

Estes resultados permitiram concluir que os extratos de *Hypoxis hemerocallidea* são ricos em compostos fenólicos e em particular em norlinhanos, característica que lhes confere propriedades antioxidantes relevantes.

A obtenção destes extratos pode ser realizada pelo método tradicional com água fervente, mas também por maceração em acetona ou etanol ou suas misturas com água, um método com menos requisitos energéticos e que pode ser facilmente adaptado a uma escala industrial.

A utilização de solventes orgânicos reduz a tendência para o desenvolvimento de microrganismos que ocorre facilmente nos extratos aquosos e facilita a eliminação do solvente sob vácuo.

As propriedades funcionais dos extratos decresceram rapidamente durante o processo de digestão intestinal pelo que a sua estabilização mediante microencapsulação ou outros processos adequados de preservação poderá permitir manter estas propriedades durante o processo digestivo.



## Referência bibliográficas

- Albrecht, C.F., Theron, E.J., Kruger, P.B., 1995. Morphological Characterization of the Cell- Growth Inhibitory Activity of Rooperol and Pharmacokinetic Aspects of Hypoxoside as an Oral Prodrug for Cancer-Therapy. *South African Med. J.* 85, 1995.
- Appleton, M.R., van Staden, J., 1995. Micropropagation of some South African hypoxis species with medicinal and horticultural potential. *Acta Horticulturae* 420, 75–77. doi:10.17660/actahortic.1995.420.19
- Bassey, K., Viljoen, A., Combrinck, S., Choi, Y.H., 2015. New phytochemicals from the corms of medicinally important South African Hypoxis species. *Phytochem. Lett.* 10, lxix–lxxv. doi:10.1016/j.phytol.2014.09.014
- Betto, P., Gabriele, C., Galeffi, C., 1992. Determination of the norlignan glucosides of Hypoxidaceae by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 594, 131–135. doi:10.20595/jjbf.19.0\_3
- Bouic, P.J.D., Etsebeth, S., Liebenberg, R.W., Albrecht, C.F., Pegel, K., van Jaarsveld, P.P., 1996. Beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside stimulate human peripheral blood lymphocyte proliferation: Implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination. *Int. J. Immunopharmacol.* 18, 693–700.
- Boukes, G.J., Van de Venter, M., 2016. In vitro modulation of the innate immune response and phagocytosis by three Hypoxis spp. and their phytosterols. *South African J. Bot.* 102, 120–126. doi:10.1016/j.sajb.2015.05.033
- Boukes, G.J., Van De Venter, M., 2012. Rooperol as an antioxidant and its role in the innate immune system: An in vitro study. *J. Ethnopharmacol.* 144, 692–699. doi:10.1016/j.jep.2012.10.014
- Bredenkamp, M.W., Drewes, S.E., Wentler, G.L., 1989. A geraniol glycoside from Hypoxis acuminata. *Phytochemistry* 28, 263–265.
- Brito, T.T. de, Soares, L.S., Furtado, M.C., Castro, A.A., G., C.M.A., 2011. Composição centesimal de inhame (*Dioscorea* sp.) in natura e minimamente processado. *Sci. Plena* 7, 1–7.
- Brown, L., Heyneke, O., Brown, D., van Wyk, J.P.H., Hamman, J.H., 2008. Impact of traditional medicinal plant extracts on antiretroviral drug absorption. *J. Ethnopharmacol.* 119, 588–592. doi:10.1016/j.jep.2008.06.028
- Chen, Y., Lin, H., Lin, M., Lin, P., Chen, J., 2019. Effects of thermal preparation and in vitro digestion on lignan profiles and antioxidant activity in defatted-sesame meal. *Food Chem. Toxicol.* 128, 89–96. doi:10.1016/j.fct.2019.03.054
- Cottica, S.M., Sabik, H., Antoine, C., Fortin, J., Graveline, N., Visentainer, J. V., Britten, M., 2015. Characterization of Canadian propolis fractions obtained from two-step sequential extraction. *LWT - Food Sci. Technol.* 60, 609–614. doi:10.1016/j.lwt.2014.08.045
- de Hoyos-Martínez, P.L., Merle, J., Labidi, J., Charrier – El Bouhtoury, F., 2019. Tannins extraction: A

- key point for their valorization and cleaner production. *J. Clean. Prod.* 206, 1138–1155. doi:10.1016/j.jclepro.2018.09.243
- Dietzch, E., Albrecht, C.F.D., Parker, M.I., 1999. Effect of rooperol on collagen synthesis and cell growth. *IUBMB Life* 48, 321–325.
- Drewes, S.E., Elliot, E., Khan, F., Dhlamini, J.T.B., Gcumisa, M.S.S., 2008. Hypoxis hemerocallidea not merely a cure for benign prostate hyperplasia. *J. Ethnopharmacol.* 119, 593–598.
- Drewes, S.E., Hall, A.J., Learmonth, R.A., Upfold, U.J., 1984. Isolation of hypoxoside from Hypoxis rooperi and synthesis of (E)-1,5-bis (3',4'- dimethoxyphenyl) pent-4-en-1- yne. *Phytochemistry* 23, 1313–1316.
- Drewes, S.E., Liebenberg, R.W., 1983. Extracts of plants from the Hypoxidaceae family for treatment of cancer. EP 92226.
- Gaidamashvili, M., van Staden, J., 2006. Prostaglandin inhibitory activity by lectin- like proteins from South African medicinal plants. *South African J. Bot.* 72, 661–663.
- Granato, D., Shahidi, F., Wrolstad, R., Kilmartin, P., Melton, L.D., Hidalgo, F.J., Miyashita, K., Camp, J. van, Alasalvar, C., Ismail, A.B., Elmore, S., Birch, G.G., Charalampopoulos, D., Astley, S.B., Pegg, R., Zhou, P., Finglas, P., 2018. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? *Food Chem.* 264, 471–475. doi:10.1016/j.foodchem.2018.04.012
- Hammerton, R.D., van Staden, J., 1988. Seed germination of Hypoxis hemerocallidea. *South African J. Bot.* 54, 1988.
- Hostettmann, K., Terreaux, C., 2000. Search for new lead compounds from higher plants. *Chim. Int. J. Chem.* 54, 652–657.
- Jordaan, A.E., 2015. The effects of the wild African Potatoe (Hypoxis hemerocallidea) supplementation on streptozotocin-induced diabetic wistar rats reproductive function. *Cape Penins. Univ. Technol.* doi:10.1377/hlthaff.2013.0625
- Karioti, A., Hadjipavlou-Litina, D., Mensah, M.L.K., Fleischer, T.C., Skaltsa, H., 2004. Composition and antioxidant activity of the essential oils of *Xylopia aethiopica* (Dun) A. Rich. (Annonaceae) leaves, stem bark, root bark, and fresh and dried fruits, growing in Ghana. *J. Agric. Food Chem.* 52, 8094–8098. doi:10.1021/jf040150j
- Katerere, D.R., Eloff, J.N., 2008. Anti-bacterial and anti-oxidant activity of Hypoxis hemerocallidea (Hypoxidaceae): Can leaves be substituted for corms as a conservation strategy? *South African J. Bot.* 74, 613–616. doi:10.1016/j.sajb.2008.02.011
- Kerwin, S.M., Jonathan, C., 2014. A concise synthesis of rooperol and related 1, 5-diarylpent-1-en-4-ynes. *Tetrahedron Lett.* 55, 137–141.
- Kruger, P.B., Albrecht, C.D.V., Liebenberg, R.W., van Jaarsveld, P.P., 1994. Studies on hypoxoside and rooperol analogues from Hypoxis rooperi and Hypoxis latifolia and their biotransformation in

- man by using high-performance liquid chromatography with in-line sorption enrichment and diode-array detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 662, 71–78.
- Laporta, O., Pérez-Fons, L., Mallavia, R., Caturla, N., Micol, V., 2007. Isolation, characterization and antioxidant capacity assessment of the bioactive compounds derived from *Hypoxis rooperi* corm extract (African potato). *Food Chem.* 101, 1425–1437. doi:10.1016/j.foodchem.2006.03.051
- Lima, K., Silva, O., Figueira, M.E., Pires, C., Cruz, D., Gomes, S., Maurício, E.M., Duarte, M.P., 2019. Influence of the in vitro gastrointestinal digestion on the antioxidant activity of *Artemisia gorgonum* Webb and *Hyptis pectinata* (L.) Poit. infusions from Cape Verde. *Food Res. Int.* 115, 150–159. doi:10.1016/j.foodres.2018.08.029
- Liu, Z., Bruins, M.E., Bruijn, W.J.C. De, Vincken, J., 2020. A comparison of the phenolic composition of old and young tea leaves reveals a decrease in flavanols and phenolic acids and an increase in flavonols upon tea leaf maturation. *J. Food Compos. Anal.* 86, 103385. doi:10.1016/j.jfca.2019.103385
- Madikizela, B., McGaw, L.J., 2019. In vitro cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Pittosporum viridiflorum* Sims and *Hypoxis colchicifolia* Baker used traditionally against cancer in Eastern Cape, South Africa. *South African J. Bot.* 126, 250–255. doi:10.1016/j.sajb.2019.06.009
- Marini-Bettolo, G.B., Nicolatti, M., Messana, I., Galeffi, C., Msonthi, J.D., Chapya, W.A., 1985. Glucosides of *Hypoxis nyasica* Bak. The structure of nyasoside, a new glucoside biologically related to hypoxoside. *Tetrahedron* 41, 665–670.
- Masondo, N.A., Makunga, N.P., 2019. Advancement of analytical techniques in some South African commercialized medicinal plants: Current and future perspectives. *South African J. Bot.* 126, 40–57. doi:10.1016/j.sajb.2019.06.037
- Matsiliza, B., Barker, N.P., 2001. A preliminary survey of plants used in traditional medicine in the Grahamstown area. *South African J. Bot.* 67, 177–182.
- Mbendana, D., Mamabolo, K., Truter, M., Kritzinger, Q., Ndhala, A.R., 2019. Practices at herbal (muthi) markets in Gauteng, South Africa and their impact on the health of the consumers: A case study of KwaMai-Mai and Marabastad muthi markets. *South African J. Bot.* 126, 30–39. doi:10.1016/j.sajb.2019.05.004
- Miller, G., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar.
- Miller, J.S., 1997. *Zulu Medicinal Plants: An Inventory* By A. Hutchings with A. H. Scott, G. Lewis, and A. B. Cunningham (University of Zululand). University of Natal Press, Pietermaritzburg. 1996. xiv + 450 pp. 21 × 29.5 cm. \$133.00. ISBN 0-86980-893-1. *J. Nat. Prod.* 60, 955. doi:10.1021/np970084y
- Mills, E., Cooper, C., Seely, D., Kanfer, I., 2005. African herbal medicines in the treatment of HIV: *Hypoxis* and *Sutherlandia*. An overview of evidence and pharmacology. *Nutr. J.* 4, 19.

- Mkhize, B.T., Adam, J.K., 2013. Changes in CD4 counts, CD8 counts and viral loads in HIV infected individuals on a herbal supplement: peer reviewed original article. *Med. Technol. SA* 27, 6–12.
- Mothibe, M.E., Sibanda, M., 2016. African Traditional Medicine: South African Perspective, in: *Traditional and Complementary Medicine*. IntechOpen, p. 13. doi:http://dx.doi.org/10.5772/57353
- Musabauane, C.T., Bwititi, P.T., Ojewole, J.A.O., 2006. Effects of oral administration of some herbal extracts on food consumption and blood glucose levels in normal and streptozotocin-treated diabetic rats. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 28, 223–228.
- Mwinga, J.L., Makhaga, N.S., Aremu, A.O., Otang-Mbeng, W., 2019. Botanicals used for cosmetic purposes by Xhosa women in the Eastern Cape, South Africa. *South African J. Bot.* 126, 4–10. doi:10.1016/j.sajb.2019.03.038
- Nair, V.D., Kanfer, I., 2008. Sterols and sterolins in *Hypoxis hemerocallidea* (African potato). *South African J. Sci.* 104, 322–324.
- Nair, V.D., Kanfer, I., 2006. High-performance liquid chromatographic method for the quantitative determination of hypoxoside in African potato (*Hypoxis hemerocallidea*) and in commercial products containing the plant material and/or its extracts. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2816–2821.
- Nair, V.D.P., Dairam, A., Agbonon, A., Arnason, J.T., Foster, B.C., Kanfer, I., 2007. Investigation of the antioxidant activity of African potato (*Hypoxis hemerocallidea*). *J. Agric. Food Chem.* 55, 1707–1711. doi:10.1021/jf0619838
- Nair, V.D.P., Kanfer, I., 2006. High-performance liquid chromatographic method for the quantitative determination of hypoxoside in African potato (*Hypoxis hemerocallidea*) and in commercial products containing the plant material and/or its extracts. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2816–2821. doi:10.1021/jf052418s
- Ncube, B., Ndhala, A.R., Okem, A., Van Staden, J., 2013. *Hypoxis* (Hypoxidaceae) in African traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* 150, 818–827. doi:10.1016/j.jep.2013.10.032
- Ndhala, A.R., Stafford, G.I., Van Staden, J., 2013. Phytosynergy in some *Hypoxis* species and pharmacological properties of a *Hypoxis*-based phytopharmaceutical formula. *J. Ethnopharmacol.* 150, 492–500. doi:10.1016/j.jep.2013.08.060
- Neves, N. de A., Stringheta, P.C., Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I., 2018. Flavonols and ellagic acid derivatives in peels of different species of jaboticaba (*Plinia* spp.) identified by HPLC-DAD-ESI/MSn. *Food Chem.* 252, 61–71. doi:10.1016/j.foodchem.2018.01.078
- Nsibande, B.E., Gustavsson, K.E., Zhu, L.H., 2018. Analysis of Health-Associated Phytochemical Compounds in Seven *Hypoxis* Species. *Am. J. Plant Sci.* 9, 571.
- Nyinawumuntu, A., 2009. Pharmacological Effects of *Hypoxis hemerocallidea* Fisch. & CA Mey.(Hypoxidaceae) Corm (“African Potato”) Aqueous Extract on Some Mammalian Extra-Vascular Smooth Muscles in vitro. University of KwaZulu-Natal.
- O’Sullivan, J., Mathison, G.E., 2005. Interference by monosaccharides with the estimation of tyrosine

- and proteins using the Folin-Ciocalteu phenol reagent. *Anal. Biochem.* 35, 540–542. doi:[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(70\)90221-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(70)90221-6).
- Oguntibeju, O.O., Meyer, S., Aboua, Y.G., Goboza, M., 2016. Hypoxis hemerocallidea Significantly Reduced Hyperglycaemia and Hyperglycaemic-Induced Oxidative Stress in the Liver and Kidney Tissues of Streptozotocin-Induced Diabetic Male Wistar Rats. Evidence-based Complement. Altern. Med. 2016. doi:10.1155/2016/8934362
- Ojewole, J.A.O., 2006. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic properties of Hypoxis hemerocallidea Fisch. & C.A. Mey. (Hypoxidaceae) corm [‘African Potato’] aqueous extract in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.* 103, 126–134. doi:10.1016/j.jep.2005.07.012
- Oliveira, K. De, Guimarães, D., Moreira, C., Batista, E., Lucena, J., Júnior, B., Ivone, M., 2013. Caracterização química e informação nutricional de fécula de batata-doce ( Ipomoea batatas L .) orgânica e biofortificada Chemical composition and nutritional facts of biofortified starch from organic sweet potato ( Ipomoea batatas L .). *Rev. Verde Agroecol. e Desenvol. Sustentável* 8, 132–138.
- Onanuga, I.O., Jogede, A.I., Offor, U., Ogedengbe, O.O., Naidu, E.C., Peter, A.I., Azu, O.O., 2018. Hypoxis hemerocallidea alters metabolic parameters and hepatic histomorphology in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic male rats under antiretroviral therapy. *Arch. Med. Sci.* 14, n.d.
- Ortega-Vidal, J., Ruiz-Riaguas, A., Fernández-de Córdova, M.L., Ortega-Barrales, P., Llorent-Martínez, E.J., 2019. Phenolic profile and antioxidant activity of Jasonia glutinosa herbal tea. Influence of simulated gastrointestinal in vitro digestion. *Food Chem.* 287, 258–264. doi:10.1016/j.foodchem.2019.02.101
- Pegel, K.H., 1979. U.S. Patent No. 4,160,860. 4,160,860.
- Pellegrini, M., Lucas-Gonzalez, R., Fernández-López, J., Ricci, A., Pérez-Álvarez, J.A., Sterzo, C. Lo, Viuda-Martos, M., 2017. Bioaccessibility of polyphenolic compounds of six quinoa seeds during in vitro gastrointestinal digestion. *J. Funct. Foods* 38, 77–88. doi:10.1016/j.jff.2017.08.042
- Pereus, D., Ghibrani, J.N., Kocyan, A., Hilomga, S., de Boer, H.J., 2019. Diversity of Hypoxis species used in ethnomedicine in Tanzania. *South African J. Bot.* 122, 336–341.
- Santos-Sánchez, N.F., Salas-Coronado, R., Villaneuva-Cañongo, C., Hernández-Carlos, B., 2016. Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism Norma, in: *Antioxidants*. IntechOpen, p. 13. doi:<http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Satheke, N.R., 2010. Comparison of secondary metabolite content and antimicrobial activity of four Hypoxis species used in traditional medicine By. University of Pretoria.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1998. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152–178. doi:10.1016/S0076-6879(99)99017-1

- Steenkamp, V., Gouws, M.C., 2006. Cytotoxicity of six South African medicinal plant extracts used in the treatment of cancer. *South African J. Bot.* 72, 630–633. doi:10.1016/j.sajb.2006.02.004
- Steenkamp, V., Grimmer, H., Semano, M., Gulumian, M., 2005. Antioxidant and genotoxic properties of South African herbal extracts. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 581, 35–42. doi:10.1016/j.mrgentox.2004.10.009
- van der Merwer, M.J., Jenkins, K., Theron, E., van der Walt, B.J., 1993. Interaction of the di-catechols rooperol and nordihydroguaiaretic acid with oxidative systems in the human blood: a structure-activity relationship. *Biochem. Pharmacol.* 45, 303–311.
- Van Wyk, J.A., Malan, F.S., Randles, J.L., 1997. How long before resistance makes it impossible to control some field strains of *Haemonchus contortus* in South Africa with any of the modern anthelmintics? *Vet. Parasitol.* 70, 111–122. doi:10.1016/S0304-4017(96)01147-8
- Verschaeve, L., Mertens, B., Ndhlala, A.R., Anthonissen, R., Gorissen, B., Van Staden, J., 2013. Investigation into the genotoxicity of water extracts from hypoxis species and a commercially available hypoxis preparation. *Phyther. Res.* 27, 350–356. doi:10.1002/ptr.4732
- Watt, J.M., Breyer-Brandwijk, M.G., 1962. The medicinal and poisonous plants of southern and eastern Africa: being an account of their medicinal and other uses, chemical composition, pharmacological effects and toxicology in man and animal. E. & S. Livingstone.
- Wong, C.C., Li, H. Bin, Cheng, K.W., Chen, F., 2006. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem.* 97, 705–711. doi:10.1016/j.foodchem.2005.05.049
- Xiao, P., Huang, H., Chen, J., Li, X., 2014. In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of *Radix Isatidis* extract and bioaccessibility of six bioactive compounds after simulated gastro-intestinal digestion. *J. Ethnopharmacol.* 157, 55–61. doi:10.1016/j.jep.2014.09.005

## Anexo A1

Tabela A1.1: Rendimentos de extração de cormos de *Hypoxis hemerocalídea* com diferentes solventes.

Cormo	Código	m (cormo,extraído)	$m_{\text{extrato}}/10 \text{ mL}$	$m_{\text{extrato}}/V_{\text{final,extrato}}$	Rendimento	
		g	(g)	(g)	(g extrato/L)	(% m/m)
B1	B1-ACE	20	0.222	5.55	22.2	27.8
	B1-ET	20	0.130	3.25	13.0	16.3
	B1-H <sub>2</sub> Oq	20	0.112	2.80	5.6	14.0
B3	B3-ACE	25	0.239	5.97	23.9	23.9
	B3-ET	25	0.231	5.78	23.1	23.1
	B3-H <sub>2</sub> Oq	25	0.179	4.48	17.9	17.9
B11	B11-100%ACE	25	0.178	4.45	17.8	17.8
	B11-75%ACE	25	0.194	4.85	19.4	19.4
	B11-50%ACE	25	0.212	5.30	21.2	21.2
	B11-25%ACE	25	0.221	5.53	22.1	22.1
	B11-100%H <sub>2</sub> O	25	0.055	1.37	5.5	5.5
B6	B6-ACE-CC1	25	0.135	3.38	13.5	13.5
	B6-ACE-CC2	25	0.136	3.41	13.6	13.6
	B6-ACE-SC1	25	0.143	3.58	14.3	14.3
	B6-ACE-SC2	25	0.142	3.55	14.2	14.2
	B6-ET-CC1	25	0.150	3.75	15.0	15.0
	B6-ET-CC2	25	0.146	3.66	14.6	14.6
	B6-ET-SC1	25	0.144	3.60	14.4	14.4
	B6-ET-SC2	25	0.143	3.57	14.3	14.3
	B6-H <sub>2</sub> Oq-CC1	25	0.137	3.43	13.7	13.7
	B6-H <sub>2</sub> Oq-CC2	25	0.147	3.68	14.7	14.7
	B6-H <sub>2</sub> Oq-SC1	25	0.144	3.60	14.4	14.4
	B6-H <sub>2</sub> Oq-SC2	25	0.137	3.43	13.7	13.7
B12	B12-100%H <sub>2</sub> O	25	0.141	3.53	14.1	14.1
B10	B10-ACE	25	0.142	3.55	14.2	14.2
	B10-ET	25	0.150	3.75	15.0	15.0
	B10-ACE-Cascas	25	0.148	3.70	14.8	14.8
B2	B2-100%ET	25	0.276	6.90	27.6	27.6
	B2-75%ET	25	0.258	6.45	25.8	25.8
	B2-50%ET	25	0.245	6.13	24.5	24.5
	B2-25%ET	25	0.232	5.80	23.2	23.2
B5	B5-H <sub>2</sub> Oq	25	0.253	6.33	25.3	25.3

Tabela A1.2: Fenóis totais nos extratos obtidos com diferentes solventes a partir de diferentes cormos de *Hypoxis hemerocallidea*.

Solvente	Código da amostra	Concentração EAG no extrato			Massa de EAG/massa de cormo			Massa de EAG/massa de extrato		
		(mg de EAG/L)			(mg EAG/g de cormo)			(mg EAG/g de extrato)		
		<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>
Acetona	B1	6451	278	4.30	3.23	0.14	4.30	290.6	12.5	4.30
	B3	5601	23	0.41	2.24	0.01	0.41	234.4	1.0	0.41
	B6	5749	44	0.77	2.30	0.02	0.77	402.0	3.1	0.77
	B6 (dup)	5464	407	7.45	2.36	0.05	2.03	416.1	8.4	2.03
	B10	4942	0	0.00	1.98	0.00	0.17	348.0	0.6	0.17
	B11	5873	15	0.26	2.35	0.01	0.26	329.9	0.9	0.26
Solvente	Código da amostra	Concentração EAG no extrato			Massa de EAG/massa de cormo			Massa de EAG/massa de extrato		
		(mg de EAG/L)			(mg EAG/g de cormo)			(mg EAG/g de extrato)		
		<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>
Etanol	B1	6339	81	1.28	3.17	0.04	1.28	488	6	1.28
	B2	11734	0	0.00	4.69	0.03	0.70	425	3	0.70
	B3	5796	44	0.76	2.32	0.02	0.76	251	2	0.76
	B6	5067	58	1.14	2.03	0.02	1.14	352	4	1.14
	B6 (dup)	5112	27	0.52	2.04	0.01	0.52	358	2	0.52
	B10	4925	0	0.00	1.97	0.12	6.31	328	21	6.31
Solvente	Código da amostra	Concentração EAG no extrato			Massa de EAG/massa de cormo			Massa de EAG/massa de extrato		
		(mg de EAG/L)			(mg EAG/g de cormo)			(mg EAG/g de extrato)		
		<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>
H2Oq	B1	3709	15	0.39	3.71	0.01	0.39	662	3	0.39
	B3	5526	29	0.52	2.21	0.01	0.52	309	2	0.52
	B5	9289	0	0.00	3.72	0.02	0.44	367	2	0.44
	B6	4953	50	1.00	1.98	0.02	1.00	344	3	1.00
	B6 (dup)	5367	32	0.59	2.15	0.01	0.59	392	2	0.59
	B12	4066	32	0.78	1.63	0.01	0.78	288	2	0.78



Tabela A1.3: Atividade antioxidante de redução férrica nos extratos obtidos com diferentes solventes a partir de diferentes cormos de *Hypoxis hemerocallidea*.

Solvente	Código da amostra	Atividade antioxidante de redução férrica								
		(mmoles de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O/L)			(mmoles de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O/g de cormo)			(mmoles de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O/g de extrato)		
		Média	DP	CV	Média	DP	CV	Média	DP	CV
Acetona	B1	701	4	0.61	0.351	0.002	0.61	31.6	0.2	0.61
	B3	635	0	0.00	0.318	0.000	0.00	28.6	0.0	0.00
	B6	582	6	1.03	0.233	0.002	1.03	40.7	0.4	1.03
	B6 (dup)	630	2	0.27	0.252	0.001	0.27	44.4	0.1	0.27
	B10	799	4	0.54	0.319	0.002	0.54	56.2	0.3	0.54
	B11	422	15	3.46	0.169	0.006	3.46	23.7	0.8	3.46
Solvente	Código da amostra	Atividade antioxidante de redução férrica								
		(mmoles de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O/L)			(mmoles de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O/g de cormo)			(mmoles de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O/g de extrato)		
		Média	DP	CV	Média	DP	CV	Média	DP	CV
Etanol	B1	780	4	0.55	0.390	0.002	0.55	60.0	0.3	0.55
	B2	813	1	0.11	0.325	0.000	0.11	29.5	0.0	0.11
	B3	537	4	0.80	0.269	0.002	0.80	41.3	0.3	0.80
	B6	548	3	0.47	0.219	0.001	0.47	38.1	0.2	0.47
	B6 (dup)	662	0	0.00	0.265	0.000	0.00	46.4	0.0	0.00
	B10	669	6	0.90	0.267	0.002	0.90	44.6	0.4	0.90
Solvente	Código da amostra	Atividade antioxidante de redução férrica								
		(mmoles de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O/L)			(mmoles de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O/g de cormo)			(mmoles de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O/g de extrato)		
		Média	DP	CV	Média	DP	CV	Média	DP	CV
H <sub>2</sub> O <sub>q</sub>	B1	416	2	0.52	0.416	0.002	0.52	74.2	0.4	0.52
	B3	461	1	0.19	0.461	0.001	0.19	82.3	0.2	0.19
	B5	216	2	0.79	0.086	0.001	0.79	8.5	0.1	0.79
	B6	237	2	0.72	0.095	0.001	0.72	16.5	0.1	0.72
	B6 (dup)	283	2	0.76	0.113	0.001	0.76	20.7	0.2	0.76
	B12	279	2	0.61	0.112	0.001	0.61	19.8	0.1	0.61

Tabela A1.4: Atividade anti-radicalar relativamente ao DPPH dos extratos obtidos com diferentes solventes a partir de diferentes cormos de *Hypoxis hemerocallidea*.

Solvente	Código da amostra	Atividade antiradicalar relativa ao DPPH								
		(equivalentes de Trolox, mg/L)			(equivalentes de Trolox, mg/g de cormo)			(equivalentes de Trolox, mg/g de extrato)		
		<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>
Acetona	B1	3297	87	2.6	1.65	0.04	2.6	149	4	2.6
	B3	6554	37	0.6	2.62	0.01	0.6	274	2	0.6
	B6	3257	79	2.4	1.30	0.03	2.4	226	5	2.4
	B6 (dup)	5641	33	0.6	2.26	0.01	0.6	394	2	0.6
	B10	5155	61	1.2	2.06	0.02	1.2	363	4	1.2
	B11	7829	198	2.5	3.13	0.08	2.5	440	11	2.5
Solvente	Código da amostra	Atividade antiradicalar relativa ao DPPH								
		(equivalentes de Trolox, mg/L)			(equivalentes de Trolox, mg/g de cormo)			(equivalentes de Trolox, mg/g de extrato)		
		<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>
Etanol	B1	2895	43	1.5	1.45	0.02	1.5	223	3	1.5
	B2	8547	46	0.5	3.42	0.02	0.5	310	2	0.5
	B3	6849	68	1.0	2.74	0.03	1.0	296	3	1.0
	B6	5431	79	1.4	2.17	0.03	1.4	378	5	1.4
	B6 (dup)	5344	38	0.7	2.14	0.02	0.7	390	3	0.7
	B10	7420	420	5.7	2.97	0.17	5.7	501	28	5.7
Solvente	Código da amostra	Atividade antiradicalar relativa ao DPPH								
		(equivalentes de Trolox, mg/L)			(equivalentes de Trolox, mg/g de cormo)			(equivalentes de Trolox, mg/g de extrato)		
		<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>
H2Oq	B1	550	45	8.2	0.55	0.05	8.2	98	8	8.2
	B3	4429	69	1.6	1.77	0.03	1.6	247	4	1.6
	B5	3387	134	4.0	1.35	0.05	4.0	134	5	4.0
	B6	2424	361	14.9	0.97	0.14	14.9	168	25	14.9
	B6 (dup)	1713	76	4.5	0.69	0.03	4.5	120	5	4.5
	B12	3768	51	1.4	1.51	0.02	1.4	267	4	1.4

Tabela A1.5: Caracterização de extratos obtidos com misturas de acetona e água com diferentes percentagens do solvente orgânico.

Amostra	Fenóis totais								
	(mg de EAG/L)			(mg EAG/g de corno)			(mg EAG/g de extrato)		
	Média	DP	CV	Média	DP	CV	Média	DP	CV
100% ACE	5873	15	0.26	2.35	0.01	0.3	329.9	0.9	0.3
75% ACE	6310	18	0.28	2.52	0.01	0.3	325.3	0.9	0.3
50% ACE	6091	3	0.05	2.44	0.00	0.1	287.3	0.2	0.1
25% ACE	5312	40	0.75	2.12	0.02	0.8	240.4	1.8	0.8
0% ACE	1514	38	2.50	0.61	0.02	2.5	275.4	6.9	2.5
	Atividade antioxidante de redução férrica, FRAP								
	(mmoles de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O/L)			(mmoles de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O/g de corno)			(mmoles de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O/g de extrato)		
	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>
100% ACE	422.0	14.6	3.46	0.169	0.006	3.5	23.7	0.8	3.5
75% ACE	850.8	0.9	0.10	0.340	0.000	0.1	43.9	0.0	0.1
50% ACE	798.5	2.6	0.32	0.319	0.001	0.3	37.7	0.1	0.3
25% ACE	642.5	6.9	1.07	0.257	0.003	1.1	29.1	0.3	1.1
0% ACE	279.9	9.4	3.37	0.112	0.004	3.4	50.9	1.7	3.4
	Actividade antiradicalar relativa ao DPPH								
	(equivalentes de Trolox, mg/L)			(equivalentes de Trolox, mg/g de corno)			(equivalentes de Trolox, mg/g de extrato)		
	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>
100% ACE	7829	198	2.53	3.13	0.08	2.5	440	11	2.5
75% ACE	7829	198	2.53	3.13	0.08	2.5	404	10	2.5
50% ACE	5021	87	1.74	2.01	0.03	1.7	237	4	1.7
25% ACE	4427	29	0.65	1.77	0.01	0.6	200	1	0.6
0% ACE	1203	127	10.59	0.48	0.05	10.6	219	23	10.6

Tabela A1.6: Caracterização de extratos obtidos com misturas de etanol e água com diferentes percentagens do solvente orgânico.

Código da amostra	Fenóis totais								
	(mg de EAG/L)			(mg EAG/g de batata)			(mg EAG/g de extrato)		
	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>
B2 - ET - 100%	11792	163	1.386	4.72	0.07	1.39	427	6	1.39
B2 - ET - 75%	10728	147	1.372	4.29	0.06	1.37	416	6	1.37
B2 - ET - 50%	9746	114	1.174	3.90	0.05	1.17	398	5	1.17
B2 - ET - 25%	6376	90	1.410	2.55	0.04	1.41	275	4	1.41
Código da amostra	Concentração de eq. de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O no extrato			mmoles eq. de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O/ massa de batata			mmoles eq. de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O/ massa de extrato		
	(mmoles de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O/L)			(mmoles de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O/g de batata)			(mmoles de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O/g de extrato)		
	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>
B2 - ET - 100%	813.1	0.9	0.11	0.33	0.00	0.11	29.46	0.03	0.11
B2 - ET - 75%	764.5	6.0	0.79	0.31	0.00	0.79	29.63	0.23	0.79
B2 - ET - 50%	468.8	1.7	0.37	0.19	0.00	0.37	19.13	0.07	0.37
B2 - ET - 25%	429.9	1.7	0.40	0.17	0.00	0.40	18.53	0.07	0.40
Código da amostra	Actividade antiradicalar relativa ao DPPH			Actividade antiradicalar relativa ao DPPH			Actividade antiradicalar relativa ao DPPH		
	(equivalentes de Trolox, mg/L)			(equivalentes de Trolox, mg/g de batata)			(equivalentes de Trolox, mg/g de extrato)		
	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>
B2 - ET - 100%	8547	46	0.54	3.42	0.02	0.54	310	2	0.54
B2 - ET - 75%	6101	231	3.78	2.44	0.09	3.78	236	9	3.78
B2 - ET - 50%	3193	223	6.98	1.28	0.09	6.98	130	9	6.98
B2 - ET - 25%	1737	238	13.72	0.69	0.10	13.72	75	10	13.72

Tabela A1.7: Caracterização de extratos obtidos com diferentes solventes (acetona, etanol e água fervente) a partir de corno com pele ou sem pele.

Código da amostra	Fenóis totais								
	(mg de EAG/L)			(mg EAG/g de batata)			(mg EAG/g de extrato)		
	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>
B6-ACE-CC1	4937	22	0.4	1.97	0.01	0.4	366	2	0.4
B6-ACE-CC2	5143	84	1.6	2.06	0.03	1.6	378	6	1.6
B6-ACE-SC1	5749	44	0.8	2.30	0.02	0.8	402	3	0.8
B6-ACE-SC2	5764	177	3.1	2.36	0.05	2.0	416	8	2.0
B6-ET-CC1	5258	275	5.2	2.25	0.01	0.5	375	2	0.5
B6-ET-CC2	5090	69	1.4	2.04	0.03	1.4	348	5	1.4
B6-ET-SC1	5067	58	1.1	2.03	0.02	1.1	352	4	1.1
B6-ET-SC2	5112	27	0.5	2.04	0.01	0.5	358	2	0.5
B6-H20q-CC1	5985	115	1.9	2.39	0.05	1.9	437	8	1.9
B6-H20q-CC2	6665	32	0.5	2.67	0.01	0.5	453	2	0.5
B6-H20q-SC1	4953	50	1.0	1.98	0.02	1.0	344	3	1.0
B6-H20q-SC2	5367	32	0.6	2.15	0.01	0.6	392	2	0.6
Código da amostra	Atividade antioxidante de redução férrica, FRAP								
	(mmoles de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O/L)			(mmoles de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O/g de batata)			(mmoles de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O/g de extrato)		
	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>
B6-ACE-CC1	638	3	0.5	0.255	0.001	0.5	47.2	0.3	0.5
B6-ACE-CC2	653	3	0.5	0.261	0.001	0.5	48.0	0.3	0.5
B6-ACE-SC1	582	6	1.0	0.233	0.002	1.0	40.7	0.4	1.0
B6-ACE-SC2	630	2	0.3	0.252	0.001	0.3	44.4	0.1	0.3
B6-ET-CC1	518	6	1.2	0.207	0.002	1.2	34.5	0.4	1.2
B6-ET-CC2	568	3	0.5	0.227	0.001	0.5	38.8	0.2	0.5
B6-ET-SC1	548	3	0.5	0.219	0.001	0.5	38.1	0.2	0.5
B6-ET-SC2	662	0	0.0	0.265	0.000	0.0	46.4	0.0	0.0
B6-H20q-CC1	395	4	1.1	0.158	0.002	1.1	28.8	0.3	1.1
B6-H20q-CC2	433	8	1.9	0.173	0.003	1.9	29.4	0.6	1.9
B6-H20q-SC1	237	2	0.7	0.095	0.001	0.7	16.5	0.1	0.7
B6-H20q-SC2	283	2	0.8	0.113	0.001	0.8	20.7	0.2	0.8

Tabela A.1.7 (continuação)

Código da amostra	Actividade antiradicalar relativa ao DPPH								
	(equivalentes de Trolox, mg/L)			(equivalentes de Trolox, mg/g de batata)			(equivalentes de Trolox, mg/g de extrato)		
	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV</i>
B6-ACE-CC1	4090	123	3.0	1.64	0.05	3.0	303	9	3.0
B6-ACE-CC2	4398	17	0.4	1.76	0.01	0.4	323	1	0.4
B6-ACE-SC1	5641	33	0.6	2.26	0.01	0.6	394	2	0.6
B6-ACE-SC2	5155	61	1.2	2.06	0.02	1.2	363	4	1.2
B6-ET-CC1	3891	82	2.1	1.56	0.03	2.1	284	6	2.1
B6-ET-CC2	4514	134	3.0	1.81	0.05	3.0	307	9	3.0
B6-ET-SC1	5431	79	1.4	2.17	0.03	1.4	378	5	1.4
B6-ET-SC2	5344	38	0.7	2.14	0.02	0.7	390	3	0.7
B6-H20q-CC1	2626	38	1.5	1.05	0.02	1.5	175	3	1.5
B6-H20q-CC2	2847	76	2.7	1.14	0.03	2.7	195	5	2.7
B6-H20q-SC1	2424	361	14.9	0.97	0.14	14.9	168	25	14.9
B6-H20q-SC2	1713	76	4.5	0.69	0.03	4.5	120	5	4.5

Tabela A1.8: Teor de compostos fenólicos totais (mg eq. EAG/L) e atividade anti-radicalar relativa ao DPPH (mg eq. de Trolox/L) de extratos de *Hypoxis hemerocallidea*, obtidos com acetona, etanol e água fervente e dos correspondentes digeridos após digestão intestinal.

Fenóis totais (mg EAG/L)						
Amostras	Amostras originais (1 mg/mL)		Digestão Gástrica		Digestão total	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Extrato H <sub>2</sub> O (a quente)	1351	10	309	6	233	9
Extrato acetona	908	6	322	12	202	6
Extrato etanol	908	6	300	6	220	10
Atividade anti-radicalar em relação ao DPPH (mg eq. De Trolox/L)						
Amostras	Amostras originais (1 mg/mL)		Digestão Gástrica		Digestão total	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Extrato H <sub>2</sub> O (a quente)	1271	10	213	6	230	21
Extrato acetona	1117	17	190	10	148	16
Extrato etanol	841	2	150	5	207	6